



4.4.3. Studiu privind evaluarea gradului de afectare oxidativă a principalilor bioconstituenți

4.4.3. Studiu privind evaluarea gradului de afectare oxidative a principalilor bioconstituenți

Efectuat în cadrul proiectului *Abordarea bioeconomică a
agenților antimicrobieni – utilizare și
rezistență*

(cod - PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0361).

Etapa 2020

Colectiv de cercetare: asist. Oana Maria Boldura, sef.lucr. Cocan Ileana, Paul Zevedei, Blaj
Adrina, Tripon Roberta
Coordonator: conf.dr.ing. Tulcan Camelia

4.4.3. Studiu privind evaluarea gradului de afectare oxidativă a principalilor bioconstituenți

INTRODUCERE

Etapa aferentă anului 2020 a presupus analize asupra conținutului proteic al laptelui mastitic și sub-mastitic cu scopul de a pune în evidență modificările laptelui de vacă în ceea ce privește compoziția și cantitatea substanțelor de natură proteică, în încercarea de a stabili corelații ce ar putea fi transformate în markeri de identificare ai mastitelor subclinice.

Se cunoaște faptul că o parte a mecanismului de apărare a organismului contra unei infecții intramamare este reprezentată de o producere rapidă a unui influx de leucocite în lapte și o creștere a numărului de celule somatice. Creșterea permeabilității joncțiunilor strânse de pe straturile endoteliale și epiteliale ale ugerului se datorează produsilor determinați de reacțiile inflamatorii, cum ar fi histamina, TNF (Factorul de necroză tumorală), IFN-g (Interferonul gamma) și proteinele de fază acută. Această creștere a permeabilității poate constitui o parte importantă a procesului inflamator, deoarece permite componentelor imune să ajungă la locul infecției. Benites și colab. (2002) afirmă faptul că diapedeza paracelulară îmbunătățită a leucocitelor prin celulele epiteliale determină o integritate redusă a joncțiunilor strânse și, prin urmare, schimbul de constituenți între sânge și lapte pe calea paracelulară. Leucocitele predominante prezente în lapte în astfel de circumstanțe sunt reprezentate de neutrofilele polimorfonucleare (PMN). Ele sunt responsabile pentru numărul mare de celule somatice (SCC) caracteristic laptelui mastitic și sunt asociate cu multe dintre modificările compoziției laptelui survenite în timpul mastitei.

Mai mult, toxinele microbiene și enzimele din celulele deteriorate provoacă lezarea celulelor secretorii și conduc la creșterea concentrațiilor de N-acetil- β -D-glucozaminidază (NAG-ase) din lapte, proces apărut o dată cu debutul mastitei. O astfel de deteriorare celulară poate produce „găuri” în epiteliul mamar, ducând la modificări ale compoziției laptelui. De exemplu, lactoza, care este sintetizată exclusiv de celulele epiteliului mamar, trece parțial în circulația sangvină prin bariera sânge-lapte deteriorată și, simultan, determină o creștere a concentrațiilor componentelor sangvine (albumina serică, ionii de sodiu (Na⁺) și clorură) în lapte.

Mastita este însoțită de o scădere a vitezei de sinteză a laptelui și a secreției componentelor majore specifice acesteia, în timp ce secreția altor proteine precum lactoferina este reglată simultan. Concentrația cazeinelor este redusă în țesutul infectat din cauza secreției reduse și a distrugerii proteinelor din lapte și grăsimi sub acțiunea proteazelor transmise de sânge, ca de exemplu plasmina. Prin urmare, în mastite, compoziția proteică a laptelui se modifică, astfel că, deși cantitatea de lapte crește, proteinele importante ale acestuia își reduc concentrația (Tabelul 1).

Pornind de la aceste ipoteze, în studiul de față au fost analizate probe de lapte neprelucrate (colectarea nu face parte din experimentele prezentate în acest proiect) colectate din ferme locale. Criteriile după care s-au ales aceste probe au fost următoarele: o probă de lapte, reprezentând controlul a fost recoltată de la o vacă sănătoasă din punct de vedere clinic (Figura 1). O altă probă a fost reprezentată de laptele colectat de la o vacă diagnosticată cu mastită clinică severă. Probele mai sus precizate au folosite pentru

4.4.3. Studiu privind evaluarea gradului de afectare oxidativă a principalilor bioconstituenți

interpretarea variațiilor de concentrație a celor 8 probe colectate de la bovine susceptibile de mastite sub-clinice.

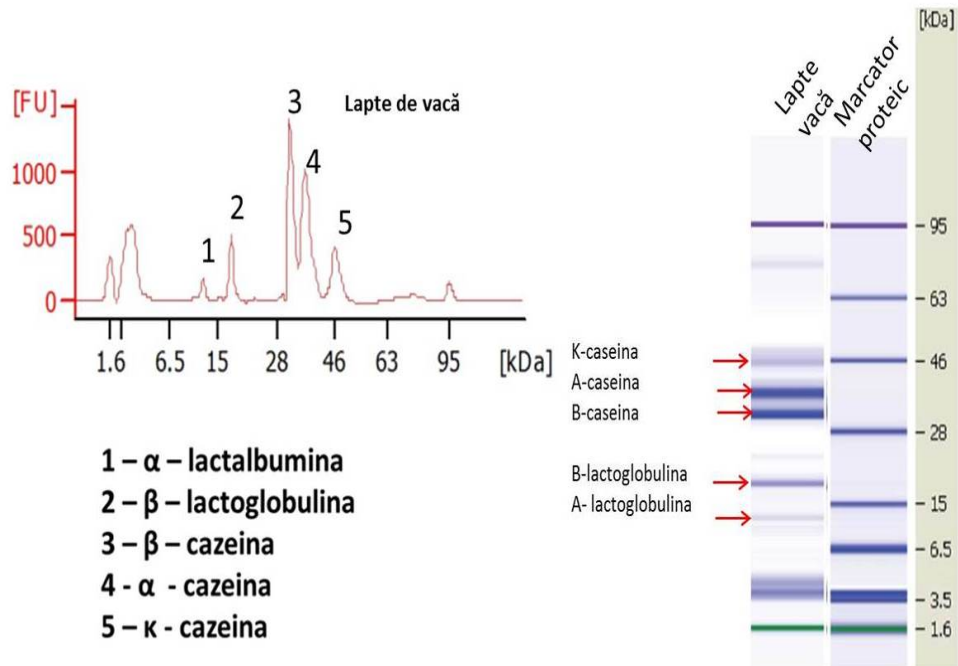


Figura 1: Principalele proteine din lapte. Amprenta proteică și electroforegrama obținute prin electroforeza microfluidică pe cip, tehnologia Agilent

Având în vedere că variațiile concentrațiilor proteice din lapte în general sunt destul de mari și nu sunt dependente în totalitate de starea patologică a animalelor, în prima etapă a acestui studiu au fost identificate cele cinci proteine principale ale laptelui de vacă, așa cum sunt evidențiate prin electroforeza microfluidică pe cip (tehnologia Agilent). Aceste proteine au fost identificate dependent de greutatea lor moleculară (exprimată în kilo - Daltoni, kDa), imaginea acestora fiind evidențiată atât pe gelul virtual, cât și pe electroforegramele obținute. Acestea au servit la estimarea concentrațiilor atât din punct de vedere cantitativ, cât și ca și procent din proteina totală (Figura 1). În paralel cu proba considerată control (reprezentând laptele provenit de la vaca sănătoasă din punct de vedere clinic), a fost analizată proba de lapte mastitic, pornind de la ideea că valorile obținute pentru concentrația proteică a celor 8 probe de lapte sub-mastitic vor fi încadrate între cele două cu istoric cunoscut. Ca și diferențe, au fost urmărite concentrațiile celor cinci fracții proteice, indicând o clasificare a gradului de afectare a ugerului, mai precis, grade ale mastitei subclinice.

Analizând datele obținute prin comparația amprentei proteice a laptelui provenit de la vaca sănătoasă clinic cu cea a laptelui mastitic, se poate observa faptul că în laptele mastitic există o creștere a conținutului total de proteine. În cazul de față, pentru laptele provenit de la vacă sănătoasă s-au înregistrat concentrații de 8681 ng/ μ l, în timp ce, pentru laptele mastitic, concentrația de proteină a fost de 18045.5 ng/ μ l, ceea ce denotă o creștere cu aproximativ 470%. Această creștere a fost atribuită fluxului de proteine transmise din

4.4.3. Studiu privind evaluarea gradului de afectare oxidativă a principalilor bioconstituenți

sânge (albumină serică, imunoglobuline, proteine serice minore, α - macroglobulină), putând fi, de asemenea, cuplată cu o scădere a concentrației cazeinei, dar și a proteinelor din zer. De asemenea, au fost înregistrate și concentrații crescute de lactoferină în timpul infecțiilor mastitice, ceea ce înseamnă că aceste proteine pot fi asociate cu funcția imună a organismelor.

Tabel 1. Rezultatele analizei comparative dintre concentrațiile proteinelor din laptele neafectat și cel mastitic

Proteina	Greutatea moleculară (kDa)	Concentrație în lapte (ng/ μ l) și procente	Concentrație în laptele mastitic (ng/ μ l)
Proteina totală	-	8681	18045.5
α -lactalbumina	12.3	207.0 (3.4%)	35.2 (0.2%)
β -lactoglobulina	18.4	768.5 (12.7%)	278.4 (1.5%)
β -cazeina	31.7	1,968.6 (32.4%)	34,8 (0.2%)
α -cazeina	37.5	2,152.9 (35.5%)	64.3 (0.4%)
κ -cazeina	45.5	657.1 (10.8%)	70.7 (0.4%)

Conform literaturii de specialitate, această creștere a proteinelor de origine serică din timpul mastitei se datorează perturbării integrității epitelului mamar de către toxinele microbiene, urmată de deschiderea joncțiunilor strânse. Totodată se observă o scădere drastică a concentrațiilor de cazeină din laptele mastitic după cum urmează: pentru α -lactalbumina s-a înregistrat o scădere cu 3.2% pe când β -lactoglobulina a înregistrat o scădere cu 11.2%. În ceea ce privește scăderile înregistrate în cazul cazeinelor, acestea sunt cu adevărat notabile. În cazul β -cazeinei procentul este de 32.2%, iar în ceea ce privește α -cazeina, acesta indică o valoare de 35.1%.

Variația absolută a concentrațiilor proteice în laptele control și laptele mastitic

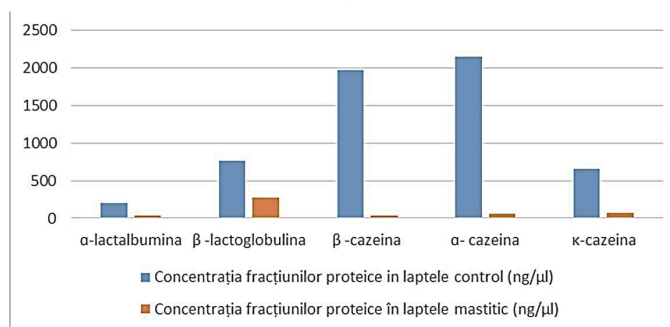


Figura 2: Reprezentarea grafică a concentrației principalelor proteine din lapte

4.4.3. Studiu privind evaluarea gradului de afectare oxidativă a principalilor bioconstituenți

Pe de altă parte este cunoscut faptul că proteinele din zer sintetizate *de novo* sunt relativ rezistente la atacul proteolitic. Cu toate acestea, se poate observa faptul că în laptele mastitic există o scădere evidentă a α -lactalbuminei și a β -lactoglobulinei.

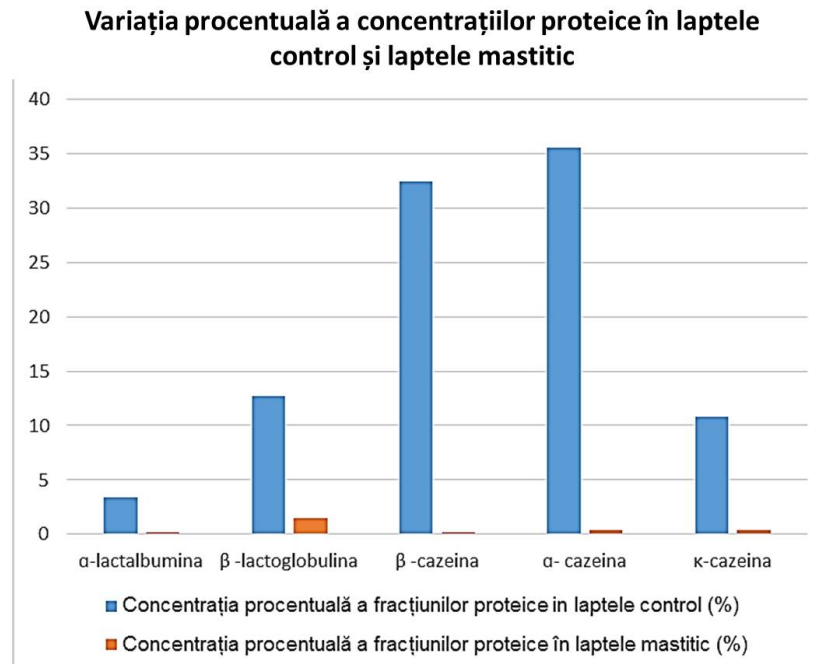


Figura 3: Reprezentarea grafică a concentrației în procente a principalelor proteine din lapte

Acest lucru s-ar datora, conform studiilor lui Auld și Hubble (1998), în cea mai mare parte funcției sintetice și a celei secretorii afectate, dar și scurgerii acestor proteine din lapte în lichidul extracelular prin căile paracelulare care proliferază în timpul mastitei. Totuși în ceea ce privește α -lactalbumina, aceasta a înregistrat valori ridicate în sângele vacilor diagnosticate cu mastită.

O scădere drastică a fost înregistrată în cazul κ -cazeinelor, cu un procent de 10.4%. Aceste dezechilibre se datorează în mare parte degradării post-secretorii a cazeinei de către proteinazele provenite de la organisme și, în parte, reducerii sintezei și secreției cazeinei ca urmare a afectării fizice.

4.4.3. Studiu privind evaluarea gradului de afectare oxidativă a principalilor bioconstituenți

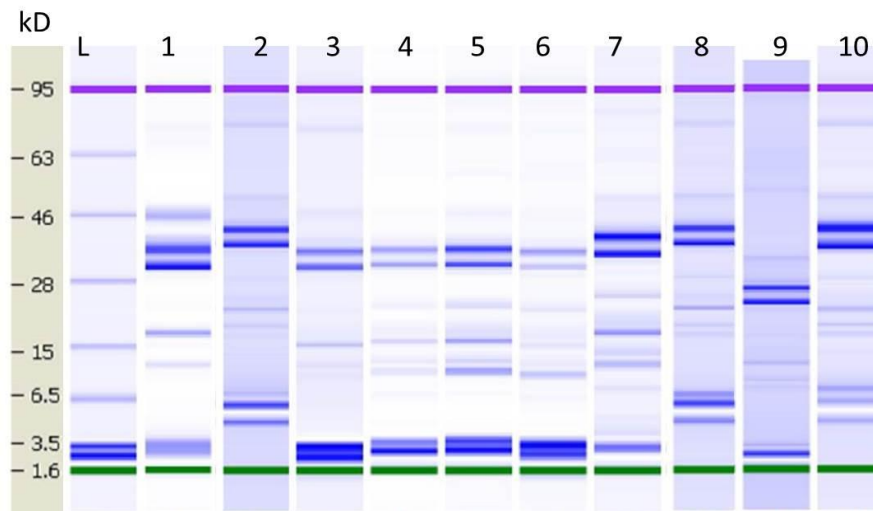


Figura 4. Amprenta proteică a probelor biologice din acest proiect obținută prin electroforeza microfluidică pe chip, tehnologia Agilent.

L – Marcator de greutate moleculară a proteinelor Protein80 Kit, Agilent; 1 – Probă lapte provenită de la bovină clinic sănătoasă; 2 – Probă lapte provenită de la bovină diagnosticată cu mastită; 3- 10 – Probe de lapte recoltate de la bovine cu mastită subclinică.

Tabel 2. Rezultatele analizei cantitative ale amprentelor proteice pentru probelor luate în studiu

Cod probă	Proteina totală, g/L	κ - caseina 45-46,5 kD g/L	α - caseina 35,5 -37kD g/L	β - caseina 31,5-33 kD g/L	β - lactoglobulina 18-19kD g/L	α -lactalbumina 12-13kD g/L
LC	32.88	3.5	12,8	9,4	3,3	1,1
LM	64,5	0,7	64,3	34,1	278,4	35,2
1	41,3	30,2	352,8	368,9	26,4	62,1
2	39,8	8,9	738,4	597,5	144	183,9
3	43,8	34,2	672,6	495,5	158,5	158,5
4	41,7	12,9	512,9	233,6	158,4	120,6
5	38,4	63,6	1773,3	55,9	817,2	647,9
6	52,6	6,5	2006,9	59,1	176,4	160,3
7	61,3	51,6	276,4	30	14,4	403,2
8	55,4	250,8	2981,6	56,3	312,1	24,1

În următoarea etapă a acestui studiu au fost analizate, alături de proba de lapte control provenită de la vacă clinic sănătoasă – LC și cea de lapte mastitic – LM, opt probe de lapte colectate de la animale diagnosticate cu mastită subclinică în diverse grade (Figura 4, Tabelul 2, Tabelul 3). Din datele obținute, se poate observa faptul că proba 1, introdusă în studiu ca și probă colectată de la vacă care manifestă mastită subclinică, are un conținut în

4.4.3. Studiu privind evaluarea gradului de afectare oxidativă a principalilor bioconstituenți

proteină totală egal cu 41,3g/L, fiind ușor mai crescut decât conținutul de proteină totală a probei de lapte control (32,88g/L) (Figura 5).

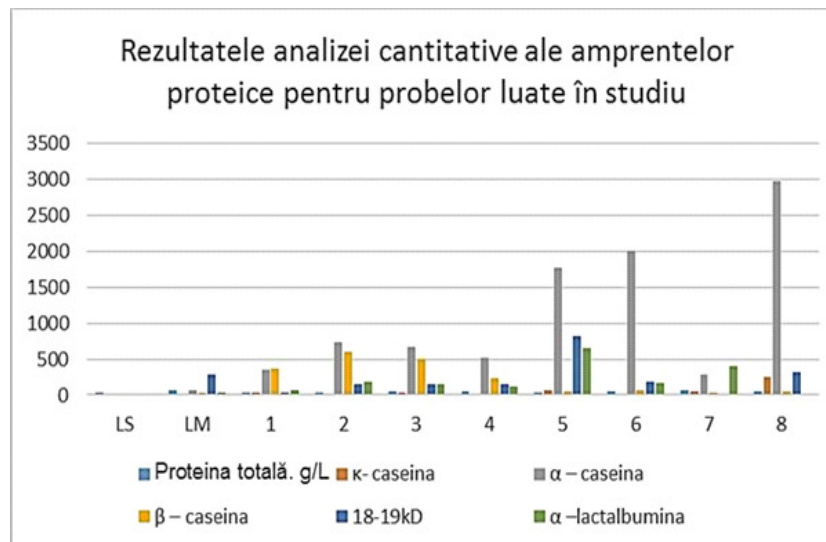


Figura 5. Reprezentarea grafică a concentrației de proteină, exprimată în grame pentru probele luate în studiu

Pentru fracțiunile proteice analizate în acest studiu (pentru proba 1) au fost obținute următoarele valori: κ-caseina a indicat o valoare de 30.2g/L, ceea ce reprezintă 5.6% din total, această valoare fiind mai scăzută decât valoarea acestei proteine din control. α - caseina a fost prezentă într-o cantitate de 352.8 g/L, reprezentând 2.4% din total, ceea ce reprezintă o valoare mai scăzută decât valoarea proteinei în laptele control. În cazul β - caseinei a fost obținută o valoare de 368.9g/L, reprezentând 33.3% din total , având o valoare mai mare în comparație cu cea a proteinei din control.

În acest caz, este foarte probabil ca alte fracțiuni proteice cu aceeași greutate moleculară cu cea a proteinei analizate să fi fost detectate. Pentru proteinele din zer, β - lactoglobulina a înregistrat o cantitate de 26.4g/L, ceea ce reprezintă 31.9% din total, valoare mai mare decât valoarea acestei proteine în control. Pentru α -lactalbumina este a fost înregistrată o valoare de 62.1g/L, reprezentând 2.7% din total, fiind o valoare mai mică decât cea a proteinei din control.

În cazul fracțiunilor proteice luate în studiu, pentru proba 2 au fost obținute următoarele valori: pentru κ-caseina o cantitate de 8.9g/L (0.4% din total), această valoare fiind mai scăzută comparativ cu valoarea acestei proteine în control; pentru α - caseina o cantitate de 738.4g/L (30.4% din total), fiind o valoare mai scăzută decât valoarea proteinei din control; pentru β - caseina o cantitate de 597.5g/L, reprezentând 24.6% din total, având o valoare mai scăzută în comparație cu cea a proteinei din control. În cazul β - lactoglobulinei, o cantitate de 144g/L a fost determinată, reprezentând 5.9% din total, valoare mai redusă decât valoarea acestei proteine în laptele control; pentru α - lactalbumina o cantitate de 183.9g/L, reprezentând 7.6% din total a fost înregistrată. Această cifră indică o valoare mai mare decât cea a proteinei din control.

4.4.3. Studiu privind evaluarea gradului de afectare oxidativă a principalilor bioconstituenți

În analizele efectuate, pentru proba 3 au fost obținute următoarele valori: pentru κ – caseina s-a înregistrat o cantitate de 34.2 g/L, reprezentând 6.6% din total, această valoare fiind mai scăzută comparativ cu valoarea proteinei din control; pentru α – caseina o cantitate de 672.6 g/L a fost determinată, acesta reprezentând 6.6% din total, fiind o valoare mai scăzută decât valoarea proteinei din control; pentru β – caseina o cantitate de 495.5 g/L, reprezentând 20.6% din total, a fost înregistrată, având o valoare mai scăzută în comparație cu cea din control; pentru β – lactoglobulina a fost determinată o cantitate de 158.5g/L, reprezentând un procent de 28% din total, valoare mai mare decât cea a proteinei din control; pentru α – lactalbumină, o cantitate de 158.5 g/L, reprezentând 6.6% din total a fost înregistrată, aceasta reprezentând o valoare mai mare decât cea a proteinei din control.

În ceea ce privește rezultatul analizei fracțiunilor proteice, pentru proba 4 au fost obținute următoarele valori: pentru κ - caseina o cantitate de 12.9 g/L, reprezentând 0.7% din total, această valoare fiind mai scăzută decât valoarea proteinei din control; pentru α – caseina o cantitate de 512.9 g/L, reprezentând 28.8% din total, fiind o valoare mai scăzută decât valoarea proteinei din control; pentru β – caseina o cantitate de 233.6 g/L, reprezentând 13.1% din total, având o valoare mai mică în comparație cu cea a proteinei din control; pentru β – lactoglobulină o cantitate de 158.4 g/L, ceea ce reprezintă 8.9% din total, valoare mai mică decât valoarea acestei proteine din control; pentru α –lactalbumină o cantitate de 120.6 g/L, reprezentând 6.8% din total, indicând o valoare mai mare decât cea a proteinei din control.

Analizând proba cu numărul 5 în acest studiu au fost notate următoarele valori: pentru κ - caseina o cantitate de 63.6 g/L, ceea ce reprezintă 0.9% din total, această valoare fiind mai scăzută decât valoarea acestei proteine în laptele control; pentru α – caseina o cantitate de 1773.3 g/L, reprezentând 24.3% din total, fiind o valoare mai scăzută decât valoarea proteinei în laptele control; pentru β – caseina o cantitate de 55.9 g/L, reprezentând 0.8% din total, având o valoare mai scăzută în comparație cu cea a proteinei din laptele control; pentru β – lactoglobulina o cantitate de 817.2 g/L, ceea ce reprezintă 11.2% din total, valoare mai redusă decât valoarea acestei proteine în laptele control; pentru α –lactalbumina o cantitate de 647.9 g/L, reprezentând 8.9% din total, ceea ce reprezintă o valoare mai mare decât cea a proteinei în laptele control.

Pentru fracțiile proteice analizate în acest studiu, pentru proba 6 au fost obținute următoarele valori: pentru κ - caseina o cantitate de 6.5 g/L, ceea ce reprezintă 0.1% din total, această valoare fiind mai scăzută decât valoarea acestei proteine în laptele control; pentru α – caseina o cantitate de 2006.9 g/L, reprezentând 16.2% din total, fiind o valoare mai scăzută decât valoarea proteinei în laptele control; pentru β – caseina o cantitate de 59.1 g/L, reprezentând 0.5% din total, având o valoare mai scăzută decât cea a proteinei din laptele control; pentru β – lactoglobulina o cantitate de 176.4 g/L, ceea ce reprezintă 1.4% din total, cu o valoare mai mică decât valoarea acestei proteine în laptele control; pentru α –lactalbumina o cantitate de 160.3 g/L, reprezentând 1.3% din total, ceea ce reprezintă o valoare mai scăzută decât cea a proteinei în laptele control.

În cazul fracțiunilor proteice luate în studiu, pentru proba 7 au fost obținute următoarele valori: pentru κ - caseina o cantitate de 51.6 g/L, reprezentând 0.7% din total, această valoare fiind mai scăzută comparativ cu valoarea acestei proteine din control; pentru α – caseina o cantitate de 276.4 g/L, reprezentând 3.8% din total, fiind o valoare mai

4.4.3. Studiu privind evaluarea gradului de afectare oxidativă a principalilor bioconstituenți

scăzută decât valoarea proteinei din control; pentru β – caseina o cantitate de 30 g/L, reprezentând 0.4% din total, având o valoare mai scăzută în comparație cu cea a proteinei din control; pentru β – lactoglobulina o cantitate de 14.4 g/L, ceea ce reprezintă 0.2% din total, valoare mai redusă decât valoarea acestei proteine în laptele control; pentru α – lactalbumina o cantitate de 403.2 g/L, reprezentând 5.6% din total, ceea ce indică o valoare mai mare decât cea a proteinei din control;

În cazul probei cu numărul 8 au fost obținute următoarele valori: pentru κ - caseina o cantitate de 250.8 g/L, reprezentând 1.9% din total, această valoare fiind mai scăzută decât valoarea proteinei din control; pentru α – caseina o cantitate de 2981.6 g/L, reprezentând 26% din total, fiind o valoare mai scăzută decât valoarea proteinei din control; pentru β – caseina o cantitate de 56.3 g/L, reprezentând 22.9% din total, având o valoare mai mică în comparație cu cea a proteinei din control; pentru β – lactoglobulina o cantitate de 312.1 g/L, ceea ce reprezintă 0.4% din total, valoare mai mică decât valoarea acestei proteine din control; pentru α – lactalbumina o cantitate de 24.1 g/L, reprezentând 0.2% din total, indicând o valoare mai scăzută decât cea a proteinei din control.

Analizând rezultatele obținute în acest studiu se evidențiază faptul că, fără echivoc, cantitatea de proteină totală crește în laptele mastitic, indiferent de gradul de afectare a mamelonului, asta deși producția totală de lapte per animal este mai redusă.

Tabel 3. Rezultatele analizei cantitative prezentate sub formă procentuală ale amprentelor proteice pentru probele luate în studiu

Cod probă	κ -caseina %	α – caseina %	β – caseina %	β – lactoglobulina %	α – lactalbumina %	Fracții proteice mici <10kD	Fracții proteice mari >95kD
LC	10.8%	35.5%	32.4%	12.7%	3.4%	0%	0%
LM	0.4%	0.4%	0,2%	1.5%	0.2%	43.2%	3.2%
1	5,6%	2,4%	33,3%	31,9%	2,7%	0%	0%
2	0,4%	30,4%	24,6%	5,9%	7,6%	0%	0%
3	6,6%	6,6%	20,6%	28%	6,6%	0%	0%
4	0,7%	28,8%	13,1%	8,9%	6,8%	0%	0%
5	0,9%	24,3%	0,8%	11,2%	8,9%	0%	4,3%
6	0,1%	16,2%	0,5%	1,4%	1,3%	0%	0%
7	0,7%	3,8%	0,4%	0,2%	5,6%	22,7%	0%
8	1,9%	26%	22,9%	0,4%	0,2%	37%	2,8%

Deși conținutul de proteină al laptelui depinde de foarte mulți factori (de exemplu furajarea, anotimpul etc.), mastita este, de asemenea, asociată cu o creștere a concentrațiilor enzimatică, care va atrage după sine creșterea concentrațiilor proteice. Aceste proteine cu rol catalitic pot juca roluri semnificative în diagnosticul mastitei subclinice. Dintre acestea se remarcă principala enzimă cazinolică din lapte, *plasmina*, care se găsește în mod normal în cantități mici în laptele neafectat. Plasmina este derivată din plasminogenul care își are originea în sânge și ajunge probabil în lapte în cantități mai mari datorită unei perturbări ale epiteliului. Funcția principală a acesteia în sânge este aceea de a contribui la dizolvarea cheagurilor. Activitatea crescută a plasminei, care are o

4.4.3. Studiu privind evaluarea gradului de afectare oxidativă a principalilor bioconstituenți

greutate moleculară de aproximativ 84 kDa, dar pe un gel de electroforeză se evidențiază în mai multe fracțiuni proteice de 68, 46.2, 23.1 și cel mai important 12.3 kDa, este identificată atât în laptele mastitic, cât și în laptele din lactația târzie. Frațiunea cea mai mică a acestei enzime are aceeași greutate moleculară cu α - lactalbumina (12,4 kDa), ceea ce le face imposibil de diferențiat în cadrul unei astfel de analize. Plasmina este foarte importantă, deoarece este capabilă să cliveze rapid α -cazeina în fragmente mai mici de γ - cazeină și polipeptidă (peptone și proteo-aze) care apoi difuzează în zer, dar care în timpul analizei efectuate pe laptele integral pot ocupa zona fracțiunilor proteice mici. Pe de altă parte aceste enzime, dar și alte proteine fără rol catalitic care sunt eliberate în lapte au, în general, greutatea moleculară mare, astfel că vor fi vizibile în zona destinată lor și vor constitui un plus destul de important în creșterea concentrației proteice a laptelui (Figura 6). Deși o creștere a cantității de proteină totală în lapte nu poate fi întotdeauna considerată un marker al mastitei, totuși atunci când aceste creșteri depășesc un procent de 50% (în studiul de față diferența între laptele control și cel mastitic a fost de 470%), diagnosticul nu mai lasă loc de interpretare.

Tendința în cazul tuturor probelor de lapte mastitic este aceea de a indica un conținut ridicat al materialului proteic, cu o scădere însă destul de drastică a procentelor celor cinci proteine principale specifice laptelui.

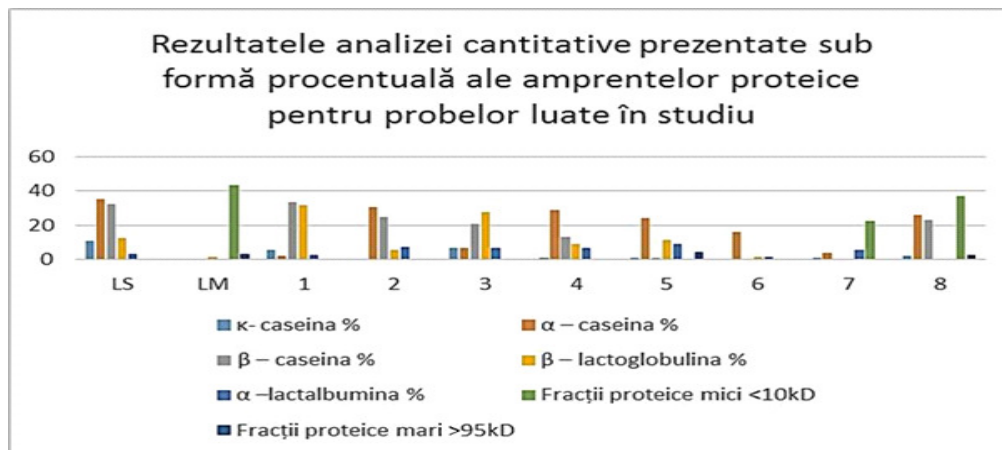


Figura 6. Reprezentarea grafică a concentrației de proteină, exprimată în grame pentru probele luate în studiu

O atenție deosebită a fost acordată și acelor fracțiuni proteice care nu au putut fi cuantificate dar au avut amprentă în analiză și anume fracțiunile proteice mari cu greutate moleculară de peste 95 kDa, precum și fracțiunile proteice cu greutate moleculară mică, sub 10 kDa. Kitul de analiză folosit în acest studiu, *Protein80 kit* este destinat analizei și cuantificării tuturor fracțiunilor proteice cu greutatea moleculară cuprinse între 1,6 – 95 kDa. În măsura în care probele analizate conțin materiale de natură proteică care depășesc limitele menționate, acestea sunt înregistrate pe gelul de electroforeză și pe electroforegramă, sunt adăugate la conținutul total de proteină, însă nu sunt cuantificate separat. Astfel, pentru proteinele din zonele cu greutate moleculară care depășesc limitele

4.4.3. Studiu privind evaluarea gradului de afectare oxidativă a principalilor bioconstituenți

kitului de analiză au existat informații despre greutatea moleculară, dar nu au fost cuantificate. Totuși, simpla lor detecție a permis emiterea unor ipoteze cu privire la concentrația în care acestea sunt întâlnite în laptele mastitic. Datele obținute în acest experiment au evidențiat faptul că în laptele provenit de la bovinele clinic sănătoase nu se înregistrează fracțiuni proteice care să depășească limitele menționate mai sus. În ceea ce privește laptele mastitic, din cele 18045.5 ng/μl, 9809 ng/μl sunt fracțiuni proteice încadrate în zona de greutate moleculară mici și, foarte probabil, sunt reprezentate de proteine ce au suferit procesul de proteoliză, fiind fracționate în părți foarte mici, pierzându-și astfel proprietățile biochimice și implicit, funcția metabolică. Tot în această categorie pot fi incluse și diferitele toxine secretate de acele microorganisme care produc infecțiile mastitice, care se acumulează în lapte. În ceea ce privește fracțiunile proteice mari, aflate peste limita de detecție superioară a kitului folosit, este foarte posibil ca în această zonă să fie detectate enzimele a căror activitate a fost identificată în laptele mastitic. În urma obținerii acestor rezultate se poate emite ipoteza conform căreia cele cinci proteine importante ale laptelui se regăsesc în cantități reduse în mastita subclinică, deși cantitatea de proteină este cu mult mai ridicată. Totodată prezența produșilor de proteoliză (fracțiuni proteice cu greutate moleculară mici), cât și a proteinelor cu greutate moleculară mare în lapte, reprezintă un indicator precis a instalării stării patologice.

În urma efectuării experimentelor descrise în acest raport se pot extrage o serie de concluzii și recomandări cu privire la schimbările compoziției proteice suferite de laptele mastitic.

Tipul de analiză prezentată în această lucrare – *Electroforeza microfluidică pe cip, tehnologia Agilent*, alternativă a metodei clasice de electroforeză a proteinelor – *SDS-PAGE* (Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis), poate fi aplicată cu succes pentru identificarea celor cinci proteine importante ale laptelui, fiind eficientă atât din punct de vedere a timpului de execuție dar, mai ales deoarece permite identificarea și cuantificarea simultană a acestor proteine.

Conținutul de material de natură proteică crește în laptele mastitic în proporții foarte mari în comparație cu laptele provenit de la animal clinic sănătos, în studiul de față înregistrându-se o creștere **de peste 470 %**.

Cu toate că laptele mastitic prezintă un conținut ridicat de proteină, toate cele cinci proteine importante ale laptelui: κ – cazeina; α – cazeina; β – cazeina; β – lactoglobulina și α – lactalbumina au înregistrat scăderi de concentrație direct proporționale cu gradul de avansare a infecției.

Dintre aceste proteine se pare că cele mai afectate sunt cele din grupa cazeinelor, în special κ – cazeina, care are și cea mai mare greutate moleculară.

Gradul de severitate al mastitei poate fi decelat în funcție de apariția fracțiunilor proteice cu greutate moleculară mici aferente produșilor de proteoliză și toxinelor, dar și a proteinelor cu greutate moleculară mare care ar putea fi reprezentate tocmai de enzimele a căror activitate în laptele mastitic este foarte ridicată.

În urma acestui tip de analiză, nu a putut fi stabilit cu exactitate un factor care ar putea fi folosit ca și marker al mastitei subclinice, însă au fost stabilite anumite condiții care, cumulate, pot conduce la stabilirea precisă a diagnosticului: **conținut de proteină foarte ridicat, scăderea concentrațiilor celor cinci proteine principale specifice**

4.4.3. Studiu privind evaluarea gradului de afectare oxidativă a principalilor bioconstituenți

laptelui, proces cumulat cu apariția materialului de natură proteică cu greutate moleculară mică și a celor cu greutate moleculară foarte mare.

BIBLIOGRAFIE

1. **Auldist, M.J., Hubble, I.B.**, 1998. Effects of mastitis on raw milk and dairy products, *The Australian Journal of Dairy Technology*, 53:p. 28-36.
2. **Bâlțeanu, V.A.**, 2010. Studiul polimorfismelor genetice ale proteinelor majore din lapte la principalele rase de taurine, bubaline, ovine și caprine din România în scopul utilizării lor ca markeri genetici în ameliorare și trasabilitate (teză de doctorat susținută în cadrul USAMV Cluj-Napoca).
3. **Benites N.R., Guerra J.L., Melville P.A., Da Costa E.O.** Aetiology and histopathology of bovine mastitis of spontaneous occurrence, *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2002;49(8):366-370. doi:10.1046/j.1439-0450.2002.00566.x.
4. **Oultram J.W., Ganda E.K., Boulding S.C., Bicalho R.C., Oikonomou G.**, 2017. A metataxonomic approach could be considered for cattle clinical mastitis diagnostics, *Front Vet Sci*. 4:36.
5. **Pyorala S.**, 2003. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis, *Vet Res*, 34(5):565-578. doi:10.1051/vetres:2003026.
6. **Tie Z, Chunguang W, Xiaoyuan W, Xinghua Z, Xiuhui Z**, 2012. Loop-mediated isothermal amplification for detection of *Staphylococcus aureus* in dairy cow suffering from mastitis, *J Biomed Biotechnol*. 2012:435982.
7. **Veloso A.C.A., Teixeira N., Ferreira I.M.**, 2002. Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and urea-polyacrylamide gel electrophoresis. Detection of milk adulterations, în *Journal of Chromatography*, 967: 209-218.