



UTARETULEHDUKSEN  
HAVAITSEMINEN  
LÄMPÖKAMERAN  
AVULLA

Helsingin yliopisto  
Eläinlääketieteellinen tiedekunta  
Kliinisen tuotantoeläinlääketieteen laitos  
Eläinlääketieteen lisensiaatin tutkielma  
ELK Anu Pirinen  
Toukokuu 2008



Tiedekunta – Fakultet - Faculty		Laitos – Institution – Department	
Eläinlääketieteellinen tiedekunta		Kliinisen tuotantoeläinlääketieteen laitos	
Tekijä - Författare – Author			
Anu Pirinen			
Työn nimi – Arbetets title – Title			
Utaretulehduksen havaitseminen lämpökameran avulla			
Oppiaine – Läroämne - Subject			
Tuotantoeläinten terveyden- ja sairaanhoito			
Työn laji – Arbetets art - Level	Aika – Datum – Month and year	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages	
Syventävät opinnot	Toukokuu 2008	44	
Tiivistelmä – Referat – Abstract			
<p>Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, pystytäänkö ja missä tulehduksen vaiheessa, utaretulehdus havaitsemaan lämpökameran avulla. Tutkimus oli pilottitutkimus. Kuudelle lypsylehmälle aiheutettiin endotoksiinimastiitti indusoimalla <i>Echerichia colin</i> endotoksiinia vasempaan etuneljännekseen. Maidosta määritettiin somaattisten solujen kokonaismäärä (SCC), maidon sähkönjohtokyky (EC), N-asetyyli-β-D-glukosaminidaasi (NAG) -aktiivisuus ja seerumin amyloidi A (SAA)-pitoisuus. Maidon muutoksia arvioitiin silmämääräisesti. Yleis- ja paikallisoireet luokiteltiin vakavuuden mukaan. Koe- ja verrokineljänneistä kuvattiin lämpökameralla, jonka antamia utareen pintalämpötiloja verrattiin edellä mainittuihin muuttujiin.</p> <p>Utaretulehdus havaittiin ensimmäisenä lehmien käyttäytymisestä. Lehmät potkivat utaretaan ja olivat levottomia jo tunnin kuluttua endotoksiini-infusiosta. Kahden tunnin kuluttua havaittiin yleisoireet (kuume, apaattisuus), paikallisoireet (utareen turvotus, kuumotus, kipu) ja maidon koostumuksen muutokset. Neljän tunnin kuluttua maidon solupitoisuus ja EC kohosivat ja myös utareen pintalämpötila nousi. NAGaasiaktiivisuus ja SAA-pitoisuus alkoivat kohota kahdeksan tunnin kuluttua induktiosta. Oireet ja tulehduksen kuvaajien muutokset maidossa vastasivat aiemmissä endotoksiinimallia käyttäneissä tutkimuksissa todettuja oireita ja muutoksia. Koe- ja verrokineljännesten utareen pintalämpötilojen ja rektaalilämmön välillä todettiin voimakas positiivinen korrelaatio eli lämpökamera mittasi lehmien yleislämpötilaa. NAGaasi-aktiivisuuden, EC:n ja solupitoisuuden nousu tapahtui samanaikaisesti lämpökamerakuvien mittaamien lämpötilojen kanssa, mutta maitomuutokset ja utareen paikallisoireet ilmenivät jo ennen mitattua utareen lämpötilan muutosta ja niiden palautuminen oli huomattavasti hitaampaa.</p> <p>Tämän tutkimuksen perusteella lämpökamera ei sovellu ainoaksi utaretulehduksen havaitsemiskeinoksi. Lämpökamera voisi kuitenkin sopia minkä tahansa kuumeisen sairauden, mukaan lukien kuumeisen utaretulehduksen, havaitsemiseen. Se mittasi tarkasti lehmän yleislämpötilan muutosta utareen pinnasta, mutta sen avulla ei pystytty havaitsemaan tulehdusprosessia utareessa ennen kuumeen nousua tai kuumeen laskemisen jälkeen.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords			
lämpökamera, utaretulehdus, endotoksiinimalli			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Kliinisen tuotantoeläinlääketieteen laitos, Viikin tiedekirjasto			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			
Valvoja Satu Pyörälä Ohjaajat Suvi Taponen ja Mari Hovinen			

## Sisällysluettelo

1. Johdanto .....	3
2. Kirjallisuuskatsaus .....	5
2.1 Lypsylehmän utaretulehdus .....	5
2.1.1 Utaretulehdusbakteerit .....	5
2.1.2 Endotoksiinimalli .....	6
2.2 Utaretulehduksen havainnointi ja mittaaminen .....	8
2.2.1 Somaattisten solujen kokonaismäärä eli SCC .....	8
2.2.2 California Mastitis Test eli CMT .....	9
2.2.3 Maidon sähkönjohtokyky eli EC .....	9
2.2.4 N-asetyyli- $\beta$ -D-glukosaminidaasi eli NAGaasi .....	10
2.2.5 Seerumin amyloidi A eli SAA .....	10
2.2.6. Utaretulehduksen havaitseminen perinteisessä lypsyssä .....	11
2.2.7 Epänormaalin maidon havaitseminen automaattilypsyssä .....	11
2.3 Lämpökamera .....	14
3 Tutkimusosa .....	19
3.1 Tutkimuksen tavoitteet .....	19
3.2 Aineisto ja menetelmät .....	19
3.2.1 Eläimet ja olosuhteet .....	19
3.2.2 Tutkimusprotokolla .....	20
3.2.4 Kliininen tutkimus ja oireiden luokittelu .....	22
3.3.5 Maitonäytteiden otto ja tutkiminen .....	23
3.2.6 Tilastollinen käsittely .....	23
3.3 Tulokset .....	24
3.3.1 Yleisoireet .....	24
3.3.2 Paikallisoireet .....	25
3.3.3 Lämpökamerakuvat .....	25
3.3.4 Somaattiset solut .....	26
3.3.5 Maidon sähkönjohtokyky .....	27
3.3.6 NAGaasi .....	29
3.3.7 SAA .....	29
3.3.8 Maitomäärä .....	30
3.4 Pohdinta .....	31

3.4.1 Endotoksiinimalli.....	31
3.4.2 Lämpökamera .....	33
3.5 Yhteenveto .....	35
4 Kiitokset.....	36
5 Lähteet .....	37

## 1. Johdanto

Automaattinen lypsy yleistyy niin Suomessa kuin maailmallakin. Suomessa oli vuonna 2000 käytössä 2 lypsyrobotia kahdella tilalla ja vuoden 2006 lopussa tilojen määrä oli jo 216 [27].

Eräs haasteista automaattilypsyn kehityksessä on kuinka maidon laatu ja eläinten hyvinvointi saadaan pidettyä hyvänä ja lain vaatimukset täytettyä. Maa- ja metsätalousministeriön (MMM) asetuksessa alkutuotannolle elintarviketurvallisuuden varmistamiseksi asetettavista vaatimuksista (134/2006) vaaditaan, että ennen kunkin lehmän lypsä lypsäjän tulee tarkastaa maidon ulkoinen laatu. Jos maidossa havaitaan jokin poikkeavuus, ei kyseisen lehmän maitoa saa toimittaa eteenpäin. Lehmät, joilla havaitaan utaretautien kliinisiä oireita, on lypsettävä viimeiseksi, erillisellä koneella tai käsin, eikä maitoa saa toimittaa meijeriin. Kulutukseen toimitettavaa maitoa ei myöskään saa lypsää lehmästä, jolla on haavoja utareessa tai vetimissä.

MMM:n asetuksen (134/2006) mukaan automaattisessa lypsylaitteistossa on oltava järjestelmä, joka itsenäisesti havaitsee ja ohjaa muuttuneen maidon erilleen elintarvikkeeksi tarkoitettusta maidosta. Automaattisessa lypsyjärjestelmässä lypsäjä ei ole paikalla tarkistamassa utaretta ja maitoa, joten tarvitaan tarkka ja reaaliajassa toimiva järjestelmä utaretulehdusten havaitsemiseksi. Tällä hetkellä käytössä olevat menetelmät mittaavat maidon sähkönjohtokykyä, värimuutoksia, maitomäärää, maidon lämpötilaa, ja uusimissa laitteissa somaattisten solujen määrää [11, 26, 53, 66]. Tutkimuksissa on kuitenkin todettu, etteivät nykyiset menetelmät havaitse riittävän luotettavasti muuttunutta maitoa tai varsinkaan subkliinistä utaretulehdusta [26, 53]. Eräs mahdollisuus utaretulehduksen havaitsemisen avuksi on lämpökamera. Tulehdusalueella verenkierto kiihtyy ja alueen lämpösäteily lisääntyy, mikä pystytään mittaamaan lämpökameralla. Tekniikan kehittymisen myötä on saatavilla tarkka ja riittävän herkkä laitteisto ruumiinlämmön mittaamiseen reaaliajassa koskettamatta eläintä. Lämpökamerakuvaus on myös mahdollista automatisoida [61].

Tutkimuksemme tavoitteena oli selvittää, soveltuuko lämpökamera avuksi kliinisen utaretulehduksen varhaiseen havaitsemiseen ja olisiko se siten sovellettavissa automaattilypsyyn ja perinteisiin pihattoihin. Halusimme selvittää, kuinka hyvin lämpökamera-

kuvat vastaavat lehmän paikallis- ja yleisoireita sekä maidon tulehduksesta johtuvia muutoksia endotoksiinimallia hyödyntäen.

## 2. Kirjallisuuskatsaus

### 2.1 Lypsylehmän utaretulehdus

#### 2.1.1 Utaretulehdusbakteerit

Utaretulehdus on edelleen suuri taloudellisten tappioiden aiheuttaja maidontuottajille. Maidon tuotanto vähenee tulehduksen ja huonolaatuisen maidon vuoksi. Lisäksi lääkintäkustannukset kasvavat, työmäärä lisääntyy ja lehmiä joudutaan karsimaan ennaikaisesti [49].

Kliinisessä utaretulehduksessa ilmenee yleisoireita, paikallisoireita ja/tai muutoksia maidossa. Subkliinisessä utaretulehduksessa lehmällä ei ole kliinisiä oireita eikä silmin havaittavia maitomuutoksia, mutta mm. maidon kokonaissolumäärä on kohonnut.

Koivula ym. (2007) keräsivät tietoa utaretulehduksen aiheuttajista Suomessa vuosina 2004-2006. Koko Suomen kattavaan tietokantaan kerättiin tulokset kliinistä- ja subkliinistä utaretulehdusta aiheuttavista bakteereista. Maitonäytteet oli lähettänyt laboratorioon joko tilallinen itse tai hoitava eläinlääkäri ja tietojen keräyksessä mukana olleet laboratoriot tekivät vuosittain suurimman osan Suomessa tehdyistä maidon bakteerimäärityksistä. Tietokanta koostui 77 051 maitonäytteestä. Kliinisistä utaretulehduksista määritettyjen bakteerien jakauma oli seuraavanlainen: *Staphylococcus aureus* 18,3 %, koagulaasinegatiiviset stafylokokit (KNS) 17,6 %, *Streptococcus uberis* 14,6 %, *Streptococcus dysgalactiae* 10,2 %, *Echerichia coli* 6,0 %, *Arganobacterium pyogenes* 2,0 %, muut (sisältää kontaminoituneet näytteet) 7,6 % ja ei kasvua 24 % . Subkliinisistä utaretulehdustapauksista määritettyjen bakteerien jakauma oli: KNS 23,5 %, *Staphylococcus aureus* 17,7 %, *Streptococcus uberis* 11,6 %, *Streptococcus dysgalactiae* 6,6 % *Corynebacterium bovis* 2,5 %, *Echerichia coli* 1,6 %, muut (sisältää kontaminoituneet näytteet) 7,8 % ja ei kasvua 28,7%.

## 2.1.2 Endotoksiinimalli

Endotoksiinimalli tarkoittaa endotoksiinilla indusoitua utaretulehdusta. Sen avulla pystytään aiheuttamaan lehmälle utareeseen tulehdusreaktio, jonka sekä paikalliset että yleisoireet ovat varsin tarkasti ennakoitavissa. Endotoksiinimalli sopii tulehdusreaktioon keskittyvään tutkimuskäyttöön paremmin kuin esim. bakteerisuspensiolla aikaan saatu tulehdusreaktio, jonka voimakkuus, eteneminen ja kesto eri lehmillä ja neljänneksissä vaihtelevat paljon [8].

Utaretulehduksen yhteydessä koliformeilla tarkoitetaan *E. coli*-lajiin sekä Klebsiella- ja Enterobacter-sukuihin kuuluvia bakteereja. *E. coli* aiheuttaa n. 85 % koliformien aiheuttamista utaretulehduksista [57]. *E. coli* kuuluu suoliston normaaliin mikrobistoon ja sitä esiintyy kaikkialla lehmän ympäristössä [10]. Tartunta tapahtuu ulosteperäisen materiaalin päästessä utareen maitotilaan vedinkanavan kautta. Myös vedinvauriot voivat toimia altistavana tekijänä. Bakteeri itse ei yleensä elä kauan utareessa, vaan tulehdusreaktio ja yleisoireet aiheutuvat bakteerin tuottamasta endotoksiinista ja lehmän elimistön reaktiosta siihen [57]. Tyypillisimmillään koli-utaretulehdus tulee vastapoikineille lehmille, kun utareen ja elimistön vastustuskyky ovat heikoimmillaan [24]. Ummessaolokaudella mm. maidon korkea laktoferriinipitoisuus suojaa lehmää koli-tulehdukselta [37].

Endotoksiini on gram-negatiivisen bakteerin soluseinämän ulkomembraanin lipopolysakkaridi. Endotoksiinivaikutus johtuu pääasiassa lipofiilisestä lipidi-A-osasta [10, 24]. Endotoksiinia vapautuu *E. coli*-bakteerien kuollessa ja jonkin verran solujakautumisen aikana. Se toimii elimistön tulehdusvasteen käynnistävänä ärsykkeenä [24, 48]. Endotoksiini sitoutuu spesifisiin reseptoreihin pääasiassa makrofagien ja jossain määrin neutrofiilisten granylosyyttien pinnalla [48].

Tulehdusreaktion käynnistyttyä utarekudoksen makrofagit, epiteelin endoteelisolut ja neutrofiiliset granulosyytit tuottavat useita tulehdusvälittäjäaineita kuten sytokiinejä (esim. TNF $\alpha$ , interleukiinit, interferonit), lipidityypisiä välittäjäaineita (esim. prostaglandiinit, leukotrieenit), vasoaktiivisia amiineja, komplementti- ja hyytymistekijöitä, proteolyttisiä entsyymejä, happiradikaaleja sekä typpioksidia [48]. Tulehdusvälittäjä-

aineet lisäävät verenkiertoa tulehdusalueella ja houkuttelevat tulehduspaikalle verenkierrosta neutrofiilejä. Ne aiheuttavat endoteelisolujen ja sileän lihaskudoksen supistumisen, jolloin verisuonten läpäisevyys lisääntyy ja proteiinirikas plasma valuu ympäröiviin kudoksiin aiheuttaen kudosturvotusta. Useat välittäjäaineet ärsyttävät utareen hermopäätteitä aiheuttaen kipu- ja kosketusherkkyyttä. Sytokiinit stimuloivat akuutin faasin proteiinien (esim. haptoglobiini, fibrinogeeni, seerumin amyloidi A) ja vähentävät eräiden proteiinien (esim. albumiini) tuotantoa maksassa [55].

Endotoksiinilla itsellään on vähän suoria toksisia vaikutuksia; vakavimmat oireet ja muutokset elimistössä aiheutuvat epäsuorasti tulehdusvälittäjäaineiden vapautumisesta [38]. Endotoksiini stimuloi monosyyttejä tuottamaan sisäisiä pyrogeenejä (IL-6, IL-2, TNF $\alpha$ ), jotka kulkeutuvat verenkierron mukana hypotalamuksen lämmönsäätelykeskukseen vapauttaen sieltä prostaglandiinia E1 ja nostaan näin kehon lämpöä lihastärinän ja metabolian kiihtymisen kautta [55].

*E. coli* aiheuttaa tyypillisesti akuutin, nopeasti etenevän tulehduksen. Alkuvaiheessa maito muuttuu vetiseksi ja kellertäväksi, myöhemmin kokkareiseksi ja paksuksi ja somaattisten solujen määrä lisääntyy voimakkaasti. Utare muuttuu kovaksi, turvonneeksi ja kipeäksi. Lehmällä on usein yleisoireita; korkea kuume, sydänfrekvenssin nousu, pötsin motiliteetin hidastuminen, syömättömyys, apatia ja maidontuotannon lasku [37]. Etumahojen toiminnanhäiriö voi johtaa ripuliin ja nestevajaukseen [48]. Kuume voi terminaalivaiheessa muuttua alilämpöisyydeksi ja verenpaine laskea voimakkaasti, mikä johtaa lopulta shokkiin ja jopa lehmän kuolemaan [10, 48].

Lehtolainen ym. (2003) tutkivat endotoksiinin vaikutuksen eroja alku- ja loppulaktaatioissa olevilla lehmillä. Poistaakseen yksilöllisten erojen vaikutuksen he käyttivät kymmentä lehmää, joille indusoiittiin endotoksiinia sekä alku- että loppulaktaation aikana. Kaikki lehmät saivat sekä paikallisia että yleisoireita. Paikallisia oireita olivat turvotus, kipu ja maidon valuttaminen tulehtuneesta neljänneksestä. Maito muuttui heramaiseksi tai märkäiseksi. Yleisoireita olivat kuume, sydänfrekvenssin kohoaminen sekä ruokahalu ja yleisvoimien heikkeneminen. Maitonäytteissä todettiin tartutetussa neljänneksessä somaattisten solujen, seerumin amyloidi-A (SAA) -pitoisuuden sekä maidon N-asetyyli- $\beta$ -D-glukosaminidaasi (NAGAasi) -aktiivisuuden suurenemista. Verinäytteissä todettiin neutrofiilien lisääntymistä sekä muutoksia veren kortisolimäärässä. Sekä maidon että

veren SAA-pitoisuudet nousivat selkeästi. Mehrzad ym. (2001) totesivat edellä mainittujen oireiden lisäksi, että maidon tuotanto vähenee sekä tulehtuneessa neljänneksessä että terveissä neljänneksissä, myös pötsin motiliteetti heikkenee ja hengitysfrekvenssi nousee. Brucmaier ym. (2004) tutkimuksessa ilmeni lisäksi sähköjohtokyvyn sekä natriumin ja kloridin lisääntymistä tulehdusmaidossa endotoksiini-induktion jälkeen.

## 2.2 Utaretulehduksen havainnointi ja mittaaminen

Maa- ja metsätalousministeriön asetuksen alkutuotannolle elintarviketurvallisuuden varmistamiseksi (134/2006) mukaan tulehdusmaitoa tai muuten muuttunutta maitoa ei saa lypsää tankkiin ja toimittaa kulutukseen, vaan se on lypsettävä erikseen. Utaretulehduksen vakavuutta voidaan arvioida monien maidosta mitattavien tulehdusmuutosten avulla.

### 2.2.1 Somaattisten solujen kokonaismäärä eli SCC

Kokonaissoluluku määritetään fluoro-optisella Fossomatic-menetelmällä. Siinä maitonäyte kuumennetaan, jolloin DNA denaturoituu ja solujen DNA värjätään DNA-spesifisellä fluoresenssiväriä (ethidiumbromidi). Solujen tuma värjäytyy ja fluoresoi UV-valossa, jolloin ne voidaan laskea automaattisella mikroskoopilla [56].

Suurin osa normaalin maidon somaattisista soluista on verestä maitoon siirtyneitä makrofageja, loput ovat neutrofiilisiä granulocytejä, lymfosyyttejä ja pieneltä osin utarekudoksen epiteelisoluja. Tulehdusmaidossa neutrofiilien granulocytejen osuus voi olla jopa yli 90 %. Laktaatiokaudella normaalin maidon kokonaissoluluku on alle 100 000 solua/ml [56]. Määrä on korkea heti poikimisen jälkeen, mutta laskee nopeasti ensimmäisen viikon aikana [56, 58]. Myös loppulaktaatiossa maidon suhteellinen solumäärä nousee usein hieman, johtuen ainakin osittain maitomäärän laskusta. Vaikka maidon kokonaissolumäärä on hyvä tulehduksen indikaattori, voi maidon soluluku nousta myös muista syistä esim. ärsytyksen tai tulehdusreaktion seurauksena [56]. SCC-määrittäminen ilmaisee luotettavammin tulehtuneen neljänneksen, jos se tehdään loppumaidosta [3].

### 2.2.2 California Mastitis Test eli CMT

CMT-testi on yksinkertainen menetelmä arvioida solujen sisältämän DNA:n määrää maidossa. Testissä sekoitetaan yhtä suuret määrät maitoa ja reagenssia, joka liuottaa solukalvot vapauttaen näin tuman DNA:n. DNA muodostaa reagenssin kanssa hyytelön, eli mitä enemmän maidossa on soluja, sitä voimakkaampi hyytelöityminen tapahtuu. Reagenssissa on mukana myös pH-indikaattori, joka reagoi värin muutoksella maidon pH-muutoksiin. Tulehdusmaito on hieman emäksisempää kuin normaali maito, joten hyytelö muuttuu tummemman violetiksi. Muutos arvioidaan visuaalisesti asteikolla 1-5 ja neljännes määritellään tulehtuneeksi, jos CMT-testin tulos on 3-5 [56].

Sargeant ym. (2001) totesivat, että CMT ja SCC molemmat soveltuvat hyvin merkittävien utaretulehdusbakteerien havaitsemiseen karjassa. CMT-testi on halpa, se voidaan tehdä lehmän vierellä ja tulos on luettavissa heti. Jos utareessa on tulehduksen merkkejä tai maito on CMT-testin asteikossa yli 3, kannattaa neljänneksestä ottaa maitonäyte bakteriologista määrittystä varten.

### 2.2.3 Maidon sähkönjohtokyky eli EC

Maidon sähkönjohtokyvyn mittaamisen käyttö utaretulehduksen havaitsemisen apuna perustuu tulehduksen aiheuttamiin muutoksiin maidon koostumuksessa. Natriumin ja kloridin määrä maidossa lisääntyy ja kaliumin määrä vähenee. pH nousee bikarbonaatti-ionien siirtyessä maitoon. Lisääntyneestä ionimäärästä ja vähentyneestä rasvapitoisuudesta johtuen maidon sähkönjohtokyky kasvaa [38, 56].

Maidon sähkönjohtokyvyn lisääntyminen osoittaa vain muutosta utarekudoksen läpäisevyydessä eikä anna selkeää tietoa sen syystä. EC tulisi mitata aina lehmä- ja neljänneskohtaisesti ja verrata neljänneksiä toisiinsa [56]. Utaretulehduksen lisäksi maidon sähkönjohtokykyyn vaikuttavat maidon lämpötila, rasva- ja kuiva-ainepitoisuus, muutokset lypsyn aikana (alkusuihkeet vs. loppumaito), vuorokausi- ja päivien väliset vaihtelut, poikimiskerta, lypsylvälin pituus ja tuotantovaihe [43, 67]. EC:n muutoksiin vaikuttavat myös esim. nännikuppien asennot, lypsyn aikana tapahtuvat ilmaryypyt, tyhjälypsy sekä maitomäärät [4, 43, 54].

Barth ym. (2003) tutkimuksessa CMT:n avulla havaittiin utaretulehdus paremmin kuin EC:n avulla. EC:n spesifisyys oli 82 % ja sensitiivisyys 69 % kun kyseessä oli utaretulehdus ja 63 % kun maidossa ei todettu bakteriologista kasvua, mutta SCC oli yli 100 000 solua/ml.

Sähkönjohtokyvyn hyviä puolia ovat, että näytteiden tutkimiseen ei tarvita kemikaaleja, se on nopea ja antaa objektiiviset numeroarvot tuloksista. EC tulisi mitata alkusuihkemaidosta, koska maidon laskeutuminen muuttaa maitokammiossa olevan maidon koostumusta ja heikentää EC-mittauksen herkkyyttä havaita utaretulehdus [3, 7]. Sähkönjohtokyvyn mittaaminen yksin ei anna luotettavaa kuvaa maidon laadusta [4, 54].

#### 2.2.4 N-asetyyli- $\beta$ -D-glukosaminidaasi eli NAGaasi

NAGaasi on solunsisäinen lysotsymaalinen entsyymi, jota vapautuu maitoon suurimaksi osaksi tulehduspaikalle tulleista neutrofiilisistä granulosyyteistä fagosytoosin ja solunhajoamisen aikana ja vaurioituneista epiteelisoluista [56, 32]. NAGaasin on havaittu useassa tutkimuksessa olevan luotettava utaretulehduksen indikaattori [30, 31, 32, 39]. NAGaasin on todettu kuvaavan hyvin tulehduksen ja kudostuhon vakavuutta; aktiivisuus nousee voimakkaasti merkittävän utaretulehdusbakteerin aiheuttamassa tulehduksessa [32]. Maidon NAGaasi-aktiivisuus on korkea alkulaktaatioissa, laskee selkeästi 30-40 vrk kuluessa poikimisesta ja nousee jälleen hieman loppulaktaatiokaudella [9, 39]. NAGaasi-aktiivisuus korreloi kokonaissolumäärän kanssa [9]. Suurin osa maidon NAGaasista on neutrofiilisten granylosyyttien ja utarekudoksesta irronneiden epiteelisolujen sisällä, joten maitonäytteen jäädyttäminen ja sulattaminen vapauttavat entsyymin ja määrittämisessä saadaan maksimiaktiivisuus [29]. NAGaasin avulla pystytään havaitsemaan hyvin myös subkliininen utaretulehdus [2,9].

#### 2.2.5 Seerumin amyloidi A eli SAA

Seerumin amyloidi A on lehmällä herkkä akuutin faasin proteiini [19, 22]. SAA tuotetaan lähinnä maksassa [23]. Utaretulehduksessa SAA-pitoisuuden on todettu nousevan nopeammin maidossa kuin seerumissa, mikä viittaa myös utareperäiseen tuotantoon [15, 36]. Utareen ulkopuolinen tulehdus lisää puolestaan SAA-pitoisuutta seerumissa, mutta

ei maidossa, eli SAA-pitoisuuden kasvuun maidossa tarvitaan utareen sisäinen stimulus [45]. Maidon SAA on osoittautunut hyväksi utaretulehdusindikaattoriksi kliinisessä utaretulehduksessa; SAA-pitoisuus terveillä lehmillä on matalampi kuin utaretulehdusta sairastavilla niin seerumissa kuin maidossakin [14, 21, 22, 36]. Sen on todettu kuvastavan myös hyvin tulehduksen vakavuutta; SAA-pitoisuus nousee voimakkaammin kohutuullisen vakavan tulehduksen kuin lievän tulehduksen yhteydessä [14].

Lehtolainen ym. (2004) tutkimuksessa SAA-pitoisuus korreloi maidon muutosten mutta ei oireiden kanssa. Oireiden ollessa vakavimmillaan SAA-pitoisuus oli vasta neljännes huippuarvostaan, joka saavutettiin oireiden jo helpotuttua. Maidon SAA-pitoisuus nousee tulehtuneessa neljänneksessä, mutta ei samalla lehmällä terveissä neljänneksissä eli se on käyttökelpoinen lähinnä neljänneskohtaisia näytteitä tutkittaessa [14]. Terveen lehmän maidossa SAA-pitoisuus on matala, mutta ternimaidosta on löydetty korkeita pitoisuuksia [40]. SAA on hyvin herkkä ja tarkka reagoimaan tulehdukseen [14].

#### 2.2.6. Utaretulehduksen havaitseminen perinteisessä lypsyssä

Perinteisessä lypsyssä lypsäjä tarkistaa aina ennen lypsyä lehmän kunnon ja ettei utareessa ole haavoja tai merkkejä tulehduksesta. Alkusuuhkeista nähdään maidon väri ja koostumus. California Mastitis Test eli CMT-testi on helppokäyttöinen ja nopea keino tarkistaa neljännesten somaattisten solujen kokonaismäärä lehmän vierellä. Jos utareessa on tulehduksen merkkejä tai maito on CMT-testin asteikossa yli 3, kannattaa neljänneksestä ottaa maitonäyte bakteriologista määrittystä varten. Somaattisten solujen ylittäessä 300 000 solua/ml eli CMT on yli 3, katsotaan neljännes tulehtuneeksi vaikka bakteriologisessa näytteessä ei todettaisikaan kasvua [56]. Jatkohoidosta päätetään bakteriologisen tuloksen perusteella.

#### 2.2.7 Epänormaalien maidon havaitseminen automaattilypsyssä

Automaattilypsyssä utaretulehdus pyritään havaitsemaan pääasiassa maidon sähkönjohtokyvyn avulla. Muita epänormaalien maidon havaitsemiskeinoja automaattilypsyssä ovat mm. maitomäärän muuttuminen, maidon värimuutokset ja maidon lämpötilamuutokset [11, 20, 53]. Epänormaali maito on muuttunut väriltään ja/tai rakenteeltaan, se

sisältää hyytymiä tai verta, kokonaissolumäärä on liian korkea tai maito on ternimaitoa [53]. Ongelmana epänormaalin maidon havaitsemisessa on menetelmien riittämätön herkkyys eli sensitiivisyys ja tarkkuus eli spesifisyys. Spesifisyyden tulisi olla vähintään 99 %, koska huono spesifisyys johtaa normaalin maidon menetykseen automaattisessa maidon lajittelussa. Sensitiivisyyden tulisi olla vähintään 80 %, kuten perinteisessä lypsässä, mutta se on vaikea saavuttaa ainakaan nykyisillä mittausmenetelmillä [53].

Nielen ym. (1992) saivat tutkimuksessaan sähköjohtokyvyille sensitiivisyydeksi 66 % ja spesifisyydeksi 94%. Kun maitomäärä ja lämpötila lisättiin sähköjohtokyvyn lisäksi utaretulehduksen havaitsemisvälineiksi, kliinisen utaretulehduksen havaitsemisessa sensitiivisyys oli 75 % ja spesifisyys 90 % [44]. Sähköjohtokyvyn sensitiivisyyttä voidaan parantaa huomioimalla tiedoissa aiempien lypsykertojen EC ja vertaamalla arvoja neljännesten välillä [53].

De Mol ym. (2001b, 2001c) tutkimuksessa kaupallisesti saatavilla oleva utaretulehduksen havainnointijärjestelmä oli käytössä neljällä tilalla useita vuosia. Havainnointi perustui sähköjohtokykyyn, ja valmistajan testien mukaan järjestelmän sensitiivisyys oli 18-36 % ja spesifisyys 98,1-99,4 %. Kun järjestelmään lisättiin havainnointiperusteeksi maitomäärä ja maidon lämpötila, saatiin merkittävyysasteella 95 % sensitiivisyydeksi 80 % ja spesifisyydeksi 95 %.

Rasmussen ym. (2004) tutkivat viiden eri automaattilypsymallin toimintaa kuudessa karjassa. He raportoivat epänormaalin maidon havaitsemisessa sensitiivisyyden olevan välillä 13-50 % ja spesifisyyden välillä 87-100%. He totesivat, että sensitiivisyys ja spesifisyys ovat liian matalia epänormaalin maidon automaattiseen hylkäämiseen ja useimmat mallit hyötyisivät kehittyneemmästä tietokonemallista tai mittauksista, jotka kohdistuisivat enemmän maidon rakenteeseen.

Hovinen ym. (2006) tutkivat kenttäolosuhteissa utaretulehduksen havaitsemista ja hälytysten luotettavuutta automaattilypsyssä. Tutkimuksessa oli 8 tilaa, joilla käytiin kerran ottamassa maitonäytteet kaikista lypsässä olevista neljänneksistä SCC-määrittystä varten. Tutkimukseen hyväksyttiin mukaan vain ne neljännekset, joiden maito ei ollut muuttanutta ja SCC oli alle 400 000 solua/ml. Jatkossa viljelijät seurasivat robotin tekemiä hälytyksiä, tutkivat hälytyksen aiheuttaneiden lehmien maidon ja kirjasivat ylös

kliiniset utaretulehdukset 15-30 vuorokauden ajan. Ryhmässä A maidon laadun havainnoimiseksi maidosta mitattiin neljänneskohtainen EC ja maitomäärän muutokset ja ryhmässä B neljänneskohtainen EC ja maidon värimuutokset. Subkliinisistä utaretulehduksista havaittiin vain pieni osa tutkittujen menetelmien avulla. Molemmissa ryhmissä maidon sähköjohtokykyyn ja ryhmässä A maitomäärään perustuen vääriä hälytyksiä tuli runsaasti. Ryhmässä A hälytysten määrä saatiin puolittumaan ja todellisten positiivisten hälytysten määrä kasvamaan 60 %:iin huomioimalla robotin tietokoneohjelmassa aiempien lypsykertojen EC. Tutkimuksessa todettiin, että ainutkaan tutkituista menetelmistä ei ollut tyydyttävä havaitsemaan kliinisesti tulehtuneita neljänneksiä. Suurin osa kliinisistä utaretulehduksista aiheutti hälytyksiä, mutta vain osassa maito ohjattiin automaattisesti erilleen.

Maidon värimuutoksen mittaus on osoittautunut lupaavaksi keinoksi havaita epänormaalia maitoa laboratorio-olosuhteissa. Ouweltjes & Hogeveen (2001) käyttivät kahdeksan lehmän tulehdusmaitoa sekä kulutusmaidosta ja lehmän verestä sekoitettua verimaitoa värimittaussensoreiden arvioimiseen. Sekä tulehdusmaito että verinen maito aiheuttivat selkeästi erilaiset väriarvot kuin normaali maito. Myös kenttäolosuhteissa tehty tutkimus antoi lupaavia tuloksia värimuutoksen mittauksen käyttömahdollisuuksista [17]. Laajempia kenttätutkimuksia kuitenkin tarvitaan luotettavan sensitiivisyyden ja spesifisyyden määrittämiseksi.

Tulevaisuudessa uuden tyyppiset sensorit tulevat olemaan kiinnostuksen kohteena automaattilypsyn utaretulehdushavainnoinnin apuna. Tutkimuksia on jo tehty maidon koostumuksen ja entsyymiaktiivisuuksien automaattisesta mittaamisesta [42, 62, 63]. Mottram ym. (2007) tutkivat monisensorisysteemin eli ”elektronisen kielen” kykyä havaita muutokset tulehdusmaidon ja normaalin maidon koostumuksessa. Systeemin sensitiivisyydeksi saatiin 93 % ja spesifisyydeksi 96 % ja menetelmällä todettiin olevan potentiaalia parantaa nykyisten lypsyrobottien utaretulehduksen havaitsemista..

Uusimmissa lypsyroboteissa on käytössä lypsyn aikainen somaattisten solujen mittausjärjestelmä. Mittausjärjestelmiä ei ole vielä tieteellisesti validoitu automaattilypsyjärjestelmiin. Whyte ym. (2004) esittelivät menetelmän, jossa solut hajotetaan liuottimella, jolloin solujen DNA vapautuu ja voidaan värjätä. Värjäyksen jälkeen SCC:n kokonaismäärä määritetään maidon fluoresenssin avulla. DeLavalilla on lypsyroboteissaan käytössä

tössä automaattinen solumittari, joka ottaa neljänneskohtaisesti maitonäytteen, värjää sen, ottaa kuvan solujen tumista ja laskee somaattisten solujen määrän n. minuutissa [68]. Lelyllä on myös markkinoimissaan lypsyroboteissa lisävarusteena tarjolla automaattinen solumittauslaite. Se ottaa neljänneskohtaisen maitonäytteen, sekoittaa sen reagenssin kanssa, mittaa muodostuneen hyytelön viskositeetin ja määrittää sen perusteella maidon soluluvun arvon. Laite toimii siis ns. automatisoituna CMT-testinä [69].

### 2.3 Lämpökamera

Lämpökameroilla havaittava lämpösäteily on elektromagneettista säteilyä, jota kohde säteilee kaikkiin suuntiin ilman välittäjäainetta, kuten ilma tai neste. Lämpökamerat luovat kuvan kohteen tuottamasta lämmöstä ja lämpötilaeroista kohteen ja ympäristön välillä. Aivan kuin näkyvää valoa, myös lämpösäteilyä voidaan optisesti tallentaa, kerätä ja muuntaa sähköiseksi signaaliksi ja videosignaaliksi, jossa kohteen emittoimat lämpötilaerot näkyvät eri väreinä. Lämpimimmät alueet kuvastuvat valkoisena tai punaisena ja viileimmät alueet sinisenä tai mustana. Koska mitattava suure on lämpö eikä valo, ei ympäristön valoisuus vaikuta kuvaan [16]. Lämpökameran käyttö tulehdusten havaitsemisen apuna on ollut voimakkaan kiinnostuksen kohteena 2000-luvulla.

Shaefer ym. (2004) selvittivät tutkimuksessaan lämpökameran käyttömahdollisuutta varhaisena havaitsemiskeinona Bovine Virus Diarrhoea eli BVD-sairaudessa ja nimenomaan sen herkkyyttä verrattuna muihin kliinisiin ja diagnostisiin keinoihin. Tutkimuksessa oli 15 seronegatiivista vasikkaa, joista 10:lle tartutettiin BVD-virus ja 5 vasikkaa toimi kontrolliryhmänä. Vasikoista otettiin lämpökamerakuvia ennen tartutusta ja tartutuksen jälkeen päivittäin. Vasikoita seurattiin 15 vrk ajan tartutuksen jälkeen ja niistä mitattiin veren ja syljen kortisoli, immunoglobuliini A (IgA) ja veren haptoglobiini seitsemänä eri päivänä. Vasikoiden yleisvointi arvioitiin ja luokiteltiin päivittäin. Lämpökamerakuvat otettiin lateraalisesti kyljestä, dorsaalisesti selästä, sorkista, silmästä (sisälsi 1 cm alueen silmämunan ympäriltä), turvasta ja korvasta.

Tutkimuksessa todettiin, että kaikista kuvauspisteistä mitattuna lämpötila oli tilastollisesti merkitsevästi korkeampi 4-5 vrk tartutuksen jälkeen kuin ennen tartutusta. Vielä merkittävämpää oli se, että silmän lämpötila oli jo ensimmäisenä päivänä tartutuksen

jälkeen tilastollisesti merkitsevästi korkeampi kuin ennen tartutusta. Lisäksi silmän lämpötilassa oli vähiten vaihteluita ja se oli herkin reagoimaan lämpötilan muutokseen ennen kuin kliiniset oireet tulivat ilmi 10 vrk kuluttua tartutuksesta. Voimakkaimmat kliiniset oireet tulivat 11 vrk tartutuksen jälkeen, jolloin myös veren haptoglobiini oli korkeimmillaan. Kortisoli ja IgA alkoivat suurentua jo pian tartutuksen jälkeen. Tutkimuksessa todettiin, että lämpökamera soveltuu hyvin avuksi tulehduksen varhaiseen havaitsemiseen. Vaikka kortisoli- ja IgA- pitoisuudet suurensivat nopeasti reaktiona sairauteen ja stressiin, ne ovat myös liiankin herkkiä ja vaihtelut terveelläkin eläimellä voivat olla suuria. Lämpökameran etuja ovat sen lisäksi, että kuvat voidaan ottaa eläintä liikuttamatta, myös mittausten herkkyys ja reaaliajassa tapahtuva tulkinta.

Steward ym. (2005) tutkivat lämpökameran soveltuvuutta eläinten hyvinvoinnin tarkkailuun ja nimenomaan stressin havaitsemiseen. He käyttivät tutkimusaineistona lypsykarjaa ja mittauspisteinä silmää. Koelehmille annettiin kortikortopiini (adrenocorticotrophic hormone eli ACTH) - ja kontrollilehmille natriumkloridi-injektio ja molemmat ryhmät altistettiin stressille eristämällä ne laumasta. Sekä ACTH:n että kortisolin pitoisuuden suureneminen osoitti, että eläin koki stressiä. Silmän lämpötila kohosi sekä ACTH- että natriumkloridi-injektion jälkeen, mutta myös ennen injektiota ilmeisesti käsittelystä johtuvan stressin seurauksena. Kokeen aikana lämpökamerakuvat silmästä ja kortisolimääritys otettiin myös molemmilla kerroilla, kun lehmille laitettiin verisuonikanyyli. Ensimmäisellä kerralla todettiin lievät muutokset molemmissa arvoissa. Toisella kerralla, noin viikon kuluttua edellisestä, molemmat arvot olivat selkeästi kohonneet. Ilmeisesti lehmät osasivat ennakoida joutuvansa toimenpiteeseen, mikä aiheutti voimakkaamman stressireaktion. Tutkimus osoitti, että lämpökamera voi toimia apuna esim. stressin havaitsemisessa, mutta jatkotutkimuksia tarvitaan edelleen.

Nikkhah ym. (2005) tutkimuksessa selvitettiin lämpökameran käyttöä apuna sorkka-kuumeen havaitsemisessa alku- ja loppulypsykaudella verrattuna silmämääräisiin poikkeavuuksiin, kuten verenpurkaumiin ja kantasyöpymiin. 16 lypsylehmää tutkittiin kahdesti: alkulypsykaudella ( $\leq 200$  vrk poikimisesta) ja loppulypsykaudella ( $> 200$  vrk poikimisesta). Sorkat arvosteltiin silmämääräisesti ja lämpökamerakuvat otettiin käsikäyttöisellä kameralla sorkkahoitoparressa sorkkahoitajan tekemän hoidon jälkeen. Kuvat otettiin dorsaalisesti ruununrajasta, kustakin kahdeksasta sorkkapuoliskosta erikseen. Kontrollialueena toimi iho ruununrajan yläpuolella. Tutkimuksessa todettiin, että alku-

lypsykaudella olevien lehmien ruununrajan lämpötila ja keskilämpötila olivat korkeammat kuin loppulypsykaudella olevien lehmien. Ruununrajan lämpötilojen ja sorkan verenpurkaumien välillä todettiin positiivinen korrelaatio. Lisäksi lämpötilan todettiin olevan korkeampi nuorilla lehmillä ja lateraaliossa eli eniten painoa kantavassa sorkkapuoliskossa. Tutkimuksen mukaan lämpökamera voisi hyvin auttaa havaitsemaan sorkkakuumeen alkulypsykaudella jo varhaisessa vaiheessa..

Eddy ym. (2001) kuvailivat artikkelissaan lämpökameran käyttömahdollisuuksia hevosen ontumien tutkimisessa. Omassa tutkimuksessaan he vertasivat lämpökameran diagnostista kykyä röntgenkuvien, ultraäänikuvantamisen ja skinttigrafian diagnostisiin mahdollisuuksiin. Kaiken kaikkiaan lämpökameran avulla havaittiin 62,5 % muilla menetelmillä diagnosoiduista vaurioista. Ultraäänikuvantamisella diagnosoiduista vaurioista lämpökameran avulla havaittiin 66,7 %, skinttografialla diagnosoiduista 75 % ja röntgenkuvilla diagnosoiduista 51,7 %.

Fonseca ym. (2006) tutkimuksessa lämpökameraa käytettiin hevosilla selän kipupisteiden havaitsemisen apuna ultraäänitutkimuksen ohella. Tutkimuksessa käytetyille 24 hevoselle tehtiin huolellinen kliininen tutkimus, jossa kaikilla todettiin kipuja rintarangan ja lantion välillä. Hevosista otettiin lämpökamerakuvia sekä lateraaliossa että dorsaaliossa, jonka jälkeen tarkasteltavat alueet tutkittiin ultraäänikuvantamisella. Kaikissa lämpökamerakuvissa havaituissa kuumissa pisteissä todettiin vaurioita myös ultraäänikuvissa, mutta joitakin ultraäänikuvantamisella havaittuja vaurioita ei havaittu lämpökamerakuvissa. Kylmät pisteet, jotka kaikki osoittautuivat selkänikamien osteoartriitiksi, korreloivat täysin ultraäänellä havaittujen muutosten kanssa. Tutkimuksessa todettiin lämpökameran olevan yhdessä kliinisen tutkimuksen ja ultraäänikuvantamisen kanssa nopea ja tehokas tapa diagnosoida hevosen selän vaurioita.

Scott ym. (2000) totesivat endotoksiinimallia hyödyntäen, että tulehduksen aiheuttama lämpötilamuutos utareessa havaittiin nopeammin lämpökameran kuin SCC:n tai seerumin albumiinin avulla. Albumiini oli huippuarvossaan 6 h endotoksiiniinduktion jälkeen, kun taas lämpökameran avulla havaittiin lämpötilamuutos jo 1 h induktiosta. Ihon lämpötilaan vaikuttaa kehon ydinlämmön siirtyminen keskustasta pintaan, lämmön siirtyminen ihon pinnalta ympäristöön. Lämpökamera voi siis olla apuna havaitsemassa

tulehdusmuutosten aiheuttamat lämpötilamuutokset jo varhaisessa vaiheessa lypsylehmillä.

Barth (2000) teki tutkimuksen lämpökameran soveltuvuudesta apukeinoksi utaretulehduksen havaitsemiseen lypsylehmillä. Kuuden lehmän utareesta otettiin lämpökamerakuvia 8 päivän ajan ennen aamulypsyä. Kuvauksen ja lypsyn jälkeen kustakin kuvatussa neljänneksestä otettiin maitonäytteet SCC-määrittystä varten. Lämpökamerakuvien perusteella utareen maitokammion alaosan lämpötilavaihtelut osoittautuivat kaikkein pienimmiksi eli alueen lämpötila ei muuttunut ympäristön lämpötilan mukaan. Lisäksi alue näkyi hyvin kaikissa kuvissa ja oli keskeinen alue tulehduksessa. Tutkimuksessa todettiin myös tilastollisesti merkitsevä korrelaatio kuvaussuunnan ja mitattujen lämpötilojen välillä. Kaudaalista kuvaussuunnasta mitattiin matalimmat keskilämmöt ja mediaalisesta korkeimmat. Ihon lämpötilan ja SCC:n suhteessa ei todettu tilastollisesti merkitsevää korrelaatiota, vaikka korkean SCC:n neljänneksissä ihon lämpötila oli hieman korkeampi kuin matalan SCC:n neljänneksissä. Yhdelle lehmistä kehittyi utaretulehdus tutkimuksen kahtena viimeisenä päivänä. Tulehdusoireet havaittiin iltalypsyn yhteydessä ja tulehtuneesta neljänneksestä otettiin lisäkuvia sekä mediaalisesti että lateraalisesti kahtena seuraavana aamuna ennen aamulypsyä. Toisin kuin oireettomissa neljänneksissä, tulehtuneen neljänneksen ihon lateraalinen lämpötila oli korkeampi kuin mediaalinen ja lämpötilamuutokset voimakkaammat. Vaikka akuutti utaretulehdus oli yksittäinen tapaus, antoi se Barthin mielestä aihetta lisätutkimukselle. Tutkimuksen mukaan lämpökamera ei sovellu avuksi subkliinisen utaretulehduksen havaitsemiseen, koska lämpötilavaihtelut ovat niin vähäisiä, että häiritsevät tekijät kuten ilman virtaukset, ympäristön lämpötila, kosteus ja verenkierron muutokset voivat peittää ne alleen.

Berry ym. (2003) käyttivät lämpökameraa tutkiakseen ympäristötekijöiden vaikutuksia utareen lämpötilaan. 10 lypsylehmän utareesta otettiin lämpökamerakuvia 2 kertaa vuorokaudessa 31 vrk ajan ja neljänä erillisenä päivänä 2 h välein läpi vuorokauden. Jokaisen kuvauksen yhteydessä lehmiltä mitattiin rektaalilämpö. Tavoitteena oli selvittää sekä vuorokausivaihtelut että päivittäiset vaihtelut utareen ihon lämpötilassa. He löysivät selkeän vuorokausirytmän utareen lämpötilassa; ihon lämpö oli korkeampi klo 4 ja klo 17 välillä kuin muulloin ja korkeimmillaan klo 9 ja klo 11 välillä. Eri päivien väliset lämpötilat vaihtelivat selkeästi. Utareen lämpötilassa oli selkeä nousu liikunnan jälkeen, vaikka ulkoilman lämpötila oli selkeästi viileämpi kuin navetan lämpötila. Rektaaliläm-

pötila ei noussut vastaavasti. Tietokonemalli pystyi kohtuullisen tarkasti ennustamaan päiväkohtaiset vaihtelut, kun malliin annettiin tiedot ympäristön lämpötilasta. Verrattuna Scott ym. (2000) tutkimukseen päiväkohtainen vaihtelu lämpötilassa oli pienempi kuin tehdyn utaretulehduksen aiheuttama muutos. He päättelivät, että lämpökamera voi toimia potentiaalisena utaretulehduksen havaintokeinona, jos ympäristön vaikutuksia lämpötilaan seurataan myös huolella.

## 3 Tutkimusosa

### 3.1 Tutkimuksen tavoitteet

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää pystyisikö lämpökamera toimimaan apuna varhaisen kliinisen utaretulehduksen havaitsemisessa ja verrata lämpökamerakuvia maidosta mitattaviin tulehdusmuutoksiin sekä yleis- ja paikallisoireisiin. Tutkimuksessa hyödynnettiin endotoksiinimallia.

### 3.2 Aineisto ja menetelmät

#### 3.2.1 Eläimet ja olosuhteet

Koe suoritettiin Helsingin yliopiston navetassa Viikissä, Helsingissä. Navetta oli parsinavetta, jossa oli kuivalanta-lannanpoistojärjestelmä ja kuivikkeena käytettiin sahanpurua ja pehkuu. Tutkimuksessa käytettiin kuutta Ayshire- ja yhtä Holstein-friisiläistä lehmää. Lehmistä viisi oli ensimmäisellä ja yksi toisella laktaatiokaudellaan ja kaikki olivat loppulaktaatiossa (155-249 vrk poikimisesta). Lehmien ruokinta koostui vapaasti tarjolla olevasta hyvälaatuisesta säilörehusta, heinästä ja väkirehusta, jota jaettiin kahdesti päivässä. Lehmät lypsettiin kahdesti päivässä, klo 5.30 ja 17.30. Päivittäinen maitomäärä vaihteli välillä 16,8-33,2 kg.

Lehmille tehtiin kliininen perustutkimus ja niiden maitonäytteistä analysoitiin tulehdusindikaattorit viikko ennen koepäivää. Tutkimuksessa huomioitiin lehmän yleistila, pötsin toiminta, utareen palpaatio, sydänsyke sekä rektaalilämpö. Kaikki lehmät olivat kliinisesti terveitä.

Lehmiltä otettiin maitonäytteet kaikista neljänneksistä. Näytteistä tutkittiin sähkönjohtokyky, CMT, SCC (maidon kokonaissolumäärä), NAGaasiensyömyaktiivisuus (N-asetyyli- $\beta$ -D-glukosaminidaasi), SAA (seerumin amyloidi A) sekä bakteerikasvu ja maidon näkyvä laatu. Maidon laatua arvioitiin silmämääräisesti asteikolla 0-2. Ennen koetta maidon laatu oli silmämääräisesti normaali ja CMT-testi koe- ja kontrollineljän-

neksissä 1-2 kaikilla lehmillä. Sähköjohtokyky oli tutkimus- ja koeneljänneksissä normaali. Kaikissa neljänneksissä SCC oli < 400 000 solua/ml ja tutkimusneljänneksissä < 100 000 solua/ml. NAGaasiaktiivisuus ja SAA-pitoisuus olivat tutkimus- ja koeneljänneksissä normaalit. Maitonäytteissä ei todettu bakteerikasvua.

### 3.2.2 Tutkimusprotokolla

Tutkimuksen kesto oli viisi päivää (päivät -1, 0, 1, 2, 3). Päivä -1 toimi kontrollipäivänä lämpökameran arvioinnille ja käyttäytymiskokeelle. Tutkimusneljännekseksi valittiin vasen etuneljännes (VE) ja kontrollina toimi kunkin lehmän oikea etuneljännes (OE). Kontrollipäivänä klo 7.00 aamulypsyn jälkeen kunkin kuuden lehmän vasempaan etuneljännekseen ruiskutettiin vedinkanavan kautta steriiliä NaCl:ia 5 ml:aa. Koepäivänä kunkin lehmän vasempaan etuneljännekseen ruiskutettiin 10µl *Escherichia coli* O55:B5 lipopolysakkaridia (Sigma®, Sigma-Aldrich., Missouri, USA) laimennettuna 5 ml:aan steriiliä NaCl:ia.

Maitomäärät mitattiin kultakin lehmältä aamu- ja iltalypsyllä tutkimuksen keston ajan eli päivästä -1 päivään 3.

pv/klo	5.00	7.00	9.00	11.00	13.00	15.00	17.00	19.00
-1	A B M	induktio NaCl	A M	A M	A M	A M	A M	A M
0	A B M	induktio endotoksiini	A M	A M	A M	A M	A M	A M
1	A B M						A M	
2	A B M						A M	
3	A B M						A M	

Taulukko 1. Maitonäytteiden otto, maitomäärän mittaus ja lämpökamerakuvien otto.

A= kliininen tutkimus (utareen palpaatio, maidon ulkonäön arviointi, rektaalilämpö, sfr, pötsin kontraktiot, yleistila), lämpökamerakuvat, maidonäytteet (SCC = somaattisten solujen kokonaismäärä, CMT = California Mastitis Test, EC = maidon sähkönjohtokyky, NAG = N-asetyyli- $\beta$ -D-glukosaminidaasi, SAA = seerumin amyloidi A).

B= bakteriologinen tutkimus

M= maitomäärä

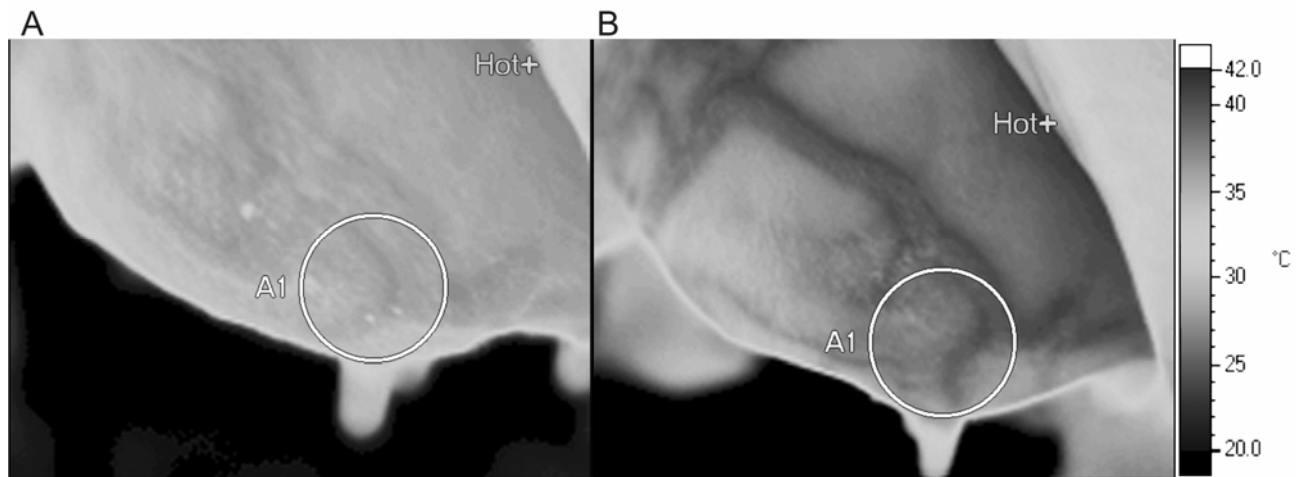
Induktio NaCl = kontrollipäivänä koeneljännekseen steriiliä NaCl

Induktio endotoksiini = koepäivänä koeneljännekseen endotoksiini

Tutkimusprotokolla oli Helsingin yliopiston eettisen komitean hyväksymä.

### 3.2.3 Lämpökamera

Lämpökamerakuvilla haluttiin seurata utareen ihon lämpötilan muutoksia kokeen aikana. Kuvat otettiin käsikäyttöisellä kameralla (IR FlexCam Pro, Infrared solutions, USA) utareen mediaali- ja lateraalipuolilta noin 50 cm:n päästä sekä koe (VE eli vasen etuneljännes)- että kontrollineljänneksestä (OE eli oikea etuneljännes) (Kuva 1). Kuvaus tapahtui ennen utareen käsittelyä ja maidonäytteiden ottoa kunakin viitenä päivänä. Kuviin piirrettiin 40x40 pikselin ympyrä manuaalisesti kameran asetuksia hyväksi käyttäen. Ympyrä alkoi juuri vetimen juuresta ja sijoittui keskelle maitokammion alaosaan. Barth (2000) totesi tutkimuksessaan tällä alueella olevan vähiten lämpötilanvaihteluita utareen ollessa normaalitilassa. Tämän alueen keskilämpötila laskettiin ja se toimi utareen lämpötilan kuvaajana sekä lateraali (alue koe) että mediaalikuviissa (alue med). Kuvan maksimilämpötilan ja -kohdan kamera antoi automaattisesti; kuvaajissa on käytetty lateraalikuvan maksimilämpötilaa (kuva max koe). Käytetty lämpökamera toimii 8-14 mikrometrin aallonpituudella. Kameran resoluutio on 0,09 °C ja se on kalibroitu välille 0 °C – 100 °C. Lämpökamera käyttää mikrobolometri-ilmaisinta 160 x 120 ilmaisinelementin fokuoivalla tasojärjestelmällä (focal plane array). Kamerassa on sisäinen itsekalibrointijärjestelmä, joka automaattisesti kalibroi anturit mittaamaan ympäristön lämpötilan oikein. Emissiivisyysarvoksi asetettiin 0,98, joka on ihmisen ihosta mitattu emissiivisyys [28].



Kuva 1. Lämpökamerakuvat tutkimusneljänneksestä (vasen etu) lateraalisesti a) ennen tulehdusta ja b) tulehduksen aikana. A1 = 40X40 pikselin alue nännin yläpuolella, Hot+ = kuvan kuumin kohta .

### 3.2.4 Kliininen tutkimus ja oireiden luokittelu

Lehmille tehtiin aina ennen näytteiden ottoa yleistutkimus, jossa huomioitiin yleistila, rektaalilämpö (°C), sydänsyke (krt/min) ja pötsin toiminta (krt/5min). Paikallisia oireita arvioitiin palpoidamalla utare ja arvioimalla maidon ulkonäköä silmämääräisesti. Yleistutkimuksen löydökset luokiteltiin asteikolla 0-2, jossa 0 = normaali, 1 = lievästi muuttunut ja 2 = selkeästi muuttunut. Yleistila katsottiin lievästi muuttuneeksi, jos lehmä oli hieman nuopea, ruokahalu oli lievästi heikentynyt ja pötsikontraktiot olivat hidastuneet (1-2 krt/5 min, normaali 3-4 krt/5 min). Selkeästi muuttuneeksi yleistila katsottiin, jos lehmä oli apaattinen, täysin syömätön ja pötsi oli pysähtynyt. Paikalliset oireet katsottiin lieviksi, jos utareessa oli hieman turvotusta, kipua ja punoitusta ja maidon koostumus oli hieman hiutaleista ja/tai väri oli lievästi muuttunut. Selkeästi muuttuneiksi paikallisoireet luokiteltiin, jos utare oli selkeästi turvoksissa, kipeä ja punoittava ja maidon koostumus oli selkeän kokkareista, vetistä ja/tai väri oli selkeästi muuttunut.

Maidon laatua arvioitiin silmämääräisesti asteikolla 0-2 ( 0 = normaali, 1 = lievästi muuttunut, 2 = selkeästi muuttunutta). Maidon katsottiin olevan lievästi muuttunutta, jos siinä oli lievää keltaisuutta ja/tai hiutaleisuutta. Selkeästi muuttuneeksi maito luokiteltiin, jos sen väri oli selkeästi keltainen, maito oli vetistä ja/tai siinä oli selkeitä hyytymiä.

### 3.3.5 Maitonäytteiden otto ja tutkiminen

Maitonäytteet otettiin 25 ml purkkeihin, joista testattiin CMT asteikolla 1-5 ja sähkönsäilykyky. 2 ml näytteestä pakastettiin ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) myöhempää NAGAasiaktiivisuuden ja SAA:n analyysia varten. Loput näytteestä lähetettiin laboratorioon SCC-analyysia varten. Bakteerinäytteet otettiin aseptiikkaa noudattaen 10 ml putkiin, jäähdytettiin jääkaappilämpötilaan ja lähetettiin laboratorioon viljeltäviksi.

Bakteriologiset näytteet tutkittiin käyttäen perinteistä viljelymenetelmää [25]. CMT tehtiin navetassa käyttäen asteikkoa 1-5 [33]. Sähkönsäilykyky mitattiin käsikäyttöisellä mittarilla (Lutron CD-4301). SCC analysoitiin sähköisellä DCC-laskijalla (DeLaval International AB, Tumba, Ruotsi). Maidon NAGAasi aktiivisuus mitattiin fluoresenssimenetelmällä [39]. SAA-pitoisuus mitattiin käyttämällä ELISAA (Tridelta Development, Wicklow, Irlanti) [14].

### 3.2.6 Tilastollinen käsittely

Utaretulehduksen vaikutusta maidon tulehdusindikaattoreihin ja utareen pintalämpötilaan mitattiin sekamallilla (mixed model), jossa otettiin huomioon toistuvat mittaukset. Kiinteitä muuttujia (fixed factors) olivat tunti (aika endotoksiini induktiosta), neljännes (koe tai kontrolli), ja tunnin ja neljänneksen välinen interaktio. Lehmä oli satunnaismuuttuja (random factor). Kovariaatteja ei käytetty. Utaretulehduksen vaikutusta lehmän rektaalilämpöön mitattiin yllä olevan kaltaisella mallilla, jossa vain tunti oli kiinteä muuttuja. Jakaumien normalisuus tarkistettiin residuaaleista. Varianssien homogeenisuus tarkistettiin residuaalien ja ennustearvojen hajontakuvioista. SAA-arvojen tilastollista käsittelyä ei tehty, koska malli ei toiminut SAA-arvojen suuren lehmäkohtaisen vaihtelun vuoksi. Lehmän rektaalilämmön ja utareen pintalämmön välinen korrelaatio määritettiin Pearsonin korrelaatiokertoimen avulla. Tilastollinen testaus tehtiin Windowsin SPSS 13.0 -ohjelmalla (SPSS Inc. 2004).

### 3.3 Tulokset

#### 3.3.1 Yleisoireet

Kaikille kuudelle lehmälle kehittyi yleisoireita endotoksiini-induktion jälkeen. Yleisoireet olivat vakavimmillaan 4-8 h induktion jälkeen, jolloin lehmät olivat selkeästi kuumaisia, apaattisia ja ruokahaluttomia. Yleisoireet olivat normalisoituneet 12 h kuluessa. Rektaalilämpö alkoi nousta 2-4 h induktiosta ja oli tilastollisesti merkitsevästi koholla 4-8 tuntia induktiosta ( $p < 0,001$ ) Korkein arvo saavutettiin 6 tuntia induktiosta (vaihtelu välillä 39,2-41,6 °C). Yhdellä lehmällä ei noussut missään vaiheessa kuumetta ( $> 39,5$  °C). Sydänsyke alkoi kohota 2-6 h induktiosta, oli huipussaan 6-10 h kuluttua (vaihtelu välillä 108-126 krt/min) ja palautui normaaliksi 22 h kuluessa. Vaihtelut sydänsykeissä eri tutkimushetkinä saattoivat osittain johtua väkirehualtomaatista, joka jakoi rehua juuri ennen kliinistä tutkimusta aamulla ja illalla.

Pötsin toiminta hidastui kolmella lehmällä lievästi 4 h induktiosta ja normalisoitui 12 h kuluessa; kolmella lehmällä ei pötsin toiminnassa havaittu muutoksia.

Yleistila heikkeni lievästi kaikilla lehmillä alkaen 2 h induktiosta ja palautui normaaliksi 12 h kuluessa. Yhdellä lehmistä oli hieman vakavammat oireet kuin muilla (tärinää, täydellistä syömättömyyttä, kuume 41,6 °C) 4-6 h tartutuksesta, mutta yleistilan ei katsottu olevan kuitenkaan vakavasti muuttunut. Käyttäytymisen muutos eli levottomuus ja utareen potkiminen havaittiin ennen mitään muita oireita.

Päivän 2 iltana yhdelle lehmistä oli noussut kuumetta (40,3 °C), lehmä tärisi, oli vaisu ja söi huonosti. Lehmälle annettiin kerta-annos tulehduskipulääkettä (ketoprofeeni i.m.) laskemaan kuumetta. Seuraavana päivänä kuume oli laskenut, eikä se enää noussut tutkimusjakson aikana. VE:sta eli koeneljänneksestä otetussa bakteriologisessa näytteessä todettiin Klebsiella-bakteerikasvu. Kyseisen lehmän näytetulokset on poistettu tuloksista kolmesta viimeisestä mittauksesta.

### 3.3.2 Paikallisoireet

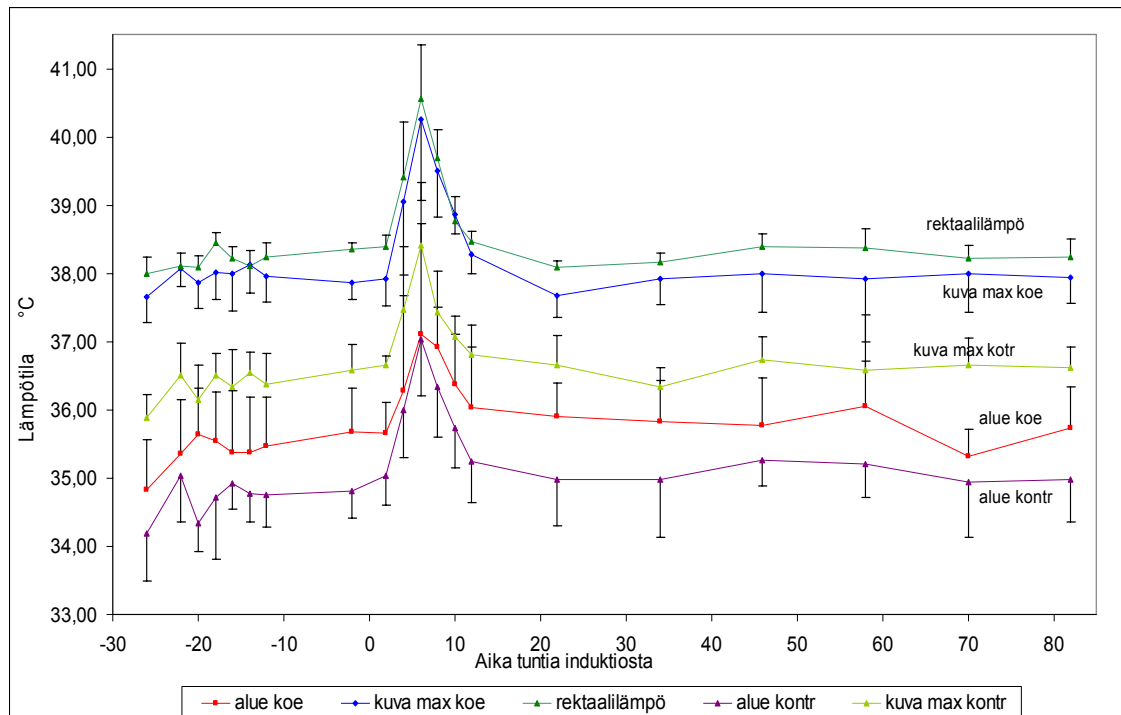
Lieviä paikallisoireita oli havaittavissa jo 2 h ja vakavia oireita 4 h induktiosta. Utareen turvotus, kuumotus ja kipu olivat vakavimmillaan 4-12 h induktiosta (asteikossa arvo 2). Yhdellä lehmällä utareen paikallisoireet pysyivät lievinä koko tutkimusajan ja samalla lehmällä utare palautui normaaliksi päivän 3 iltaan mennessä. Viidellä lehmällä utareen paikallisoireet säilyivät lievinä tutkimusajan loppuun saakka.

Maidon ulkonäkö alkoi muuttua lievästi 2-4 h induktiosta ja vain kahdella lehmällä maito muuttui selkeästi. Maidon lievät muutokset säilyivät viidellä lehmällä tutkimusajan loppuun saakka. Paikallisia oireita tai muutoksia maidon ulkonäössä ei havaittu kontrollineljänneksissä.

### 3.3.3 Lämpökamerakuvat

Lämpökamerakuvissa havaittiin selkeä lämpötilan nousu verrattuna kontrollipäivään molemmista kuvaussuunnista (lat, med) otetuissa kuvissa sekä koe- että kontrollineljänneksissä 4 h ( $p < 0,05$ ) kuluttua induktiosta. Huippuarvo saavutettiin 6 h induktiosta ja lämpötila palautui perustasolle 10 h kuluttua induktiosta. Ihon lämpötilan nousua ei havaittu yhdellä lehmällä, jonka rektaalilämpö kohosi lievästi (max 39,2 °C). Lämpökamerakuvat sekä koe- että kontrollineljänneksestä korreloivat täysin rektaalilämmön kanssa, samoin kuvan maksimilämpötila. Lehmän utareen ihon lämpötila ei kohonnut ennen kuin rektaalilämpö oli kohonnut. Rektaalilämmön ja utareen ihon lateraalisen alueen (alue koe) lämmön välinen korrelaatio oli 0,92 ( $p < 0,001$ ) ja korrelaatio rektaalilämmön ja utareen ihon maksimilämmön välillä oli 0,98 ( $p < 0,001$ ).

Vaikka utareen reaktio ja erityisesti maitomuutokset olivat selkeitä tutkimusjakson loppuun saakka, palautui utareen ihon lämpötila perustasolle jo induktiopäivän iltana.



Kuva 1. Kuuden koelehmän utareen pintalämpötila koe- ja kontrollineljänneksissä sekä rektaalilämpötila koko koejakson ajalta. Lämpökamerakuvat on otettu lateraalisuunnasta. Kuvaajiin on merkitty keskihajonnat. *E. coli* endotoksiini indusoiitiin hetkellä 0.

Alue = utareen pinnan keskilämpötila alueelta, joka piirrettiin kuviin manuaalisesti kameran toimintoja hyväksi käyttäen. 40 × 40 pikselin kokoinen ympyrä alkoi vetimen juuresta ja sijoittui keskelle maitokammion alaosaa.

Kuva max = lämpökamerakuvien maksimilämpötila.

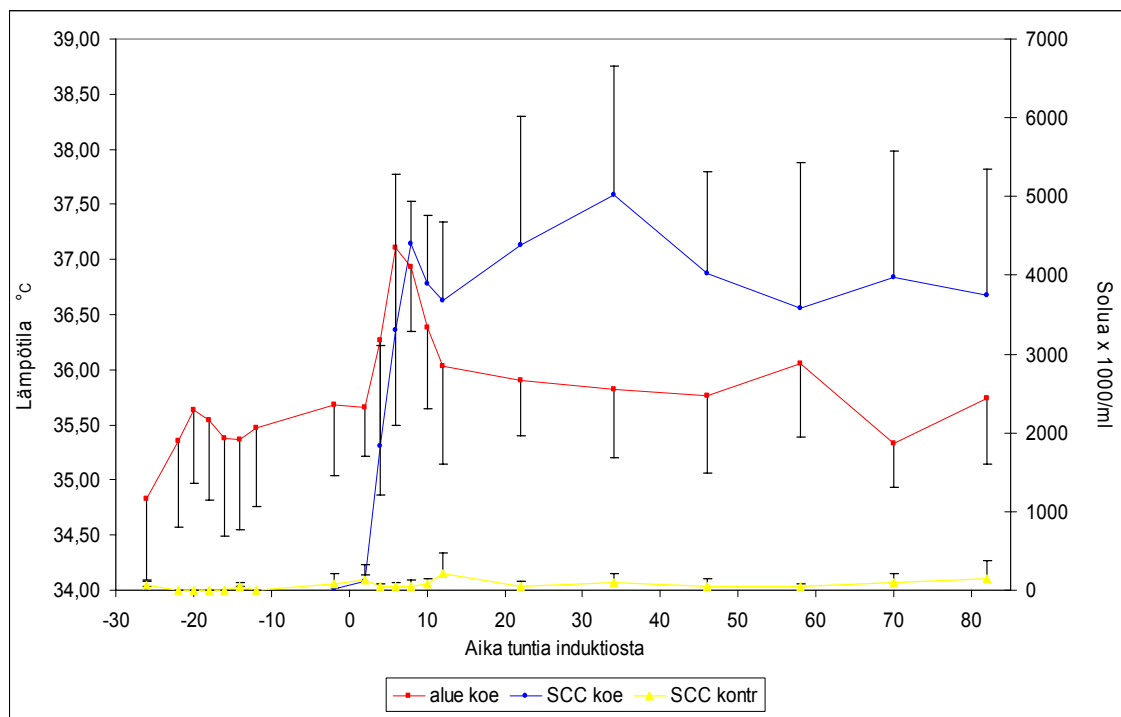
### 3.3.4 Somaattiset solut

Somaattisissa soluissa havaittiin tilastollisesti merkitsevä suureneminen verrattuna kontrollineljännekseen 4 h induktion jälkeen ( $p < 0,001$ ), mutta huippuarvo saavutettiin 34 h induktion jälkeen. Yksittäisiä näytteitä 8-10 h induktion jälkeen ei pystytty analysoimaan, koska maito oli niin voimakkaasti muuttunutta. Näihin kohtiin tilastossa tulokseksi on merkitty 5 miljoonaa solua. Kontrollineljänneksessä ei todettu solupitoisuudessa tilastollisesti merkitsevää nousua.

Koeneljänneksen maidon muutokset CMT-testissä alkoivat 4 h induktion jälkeen. Kaikilla lehmillä CMT-arvo nousi voimakkaasti (CMT 4-5) verrattuna kontrollineljännek-

seen 4-6 h induktiosta ja somaattisten solujen korkea pitoisuus säilyi viidellä lehmällä tutkimusjakson loppuun saakka. Kontrollineljänneksissä ei todettu CMT-testillä kohonnutta solupitoisuutta. CMT-testin tuloksia ei testattu tilastollisesti.

Sekä CMT-testi että SCC reagoivat maidon solumäärän kasvuun yhtä nopeasti; molemmissa arvoissa havaittiin merkitsevää suurenemista 4 tunnin kuluttua induktiosta.



Kuva 2. Kuuden koelehmän somaattisten solujen kokonaismäärän keskiarvo (SCC) koe- ja kontrollineljänneksissä koko koejakson ajalta. Kuvaajiin on merkitty keskihajonnat. *E. coli* endotoksiini indusoiittiin hetkellä 0.

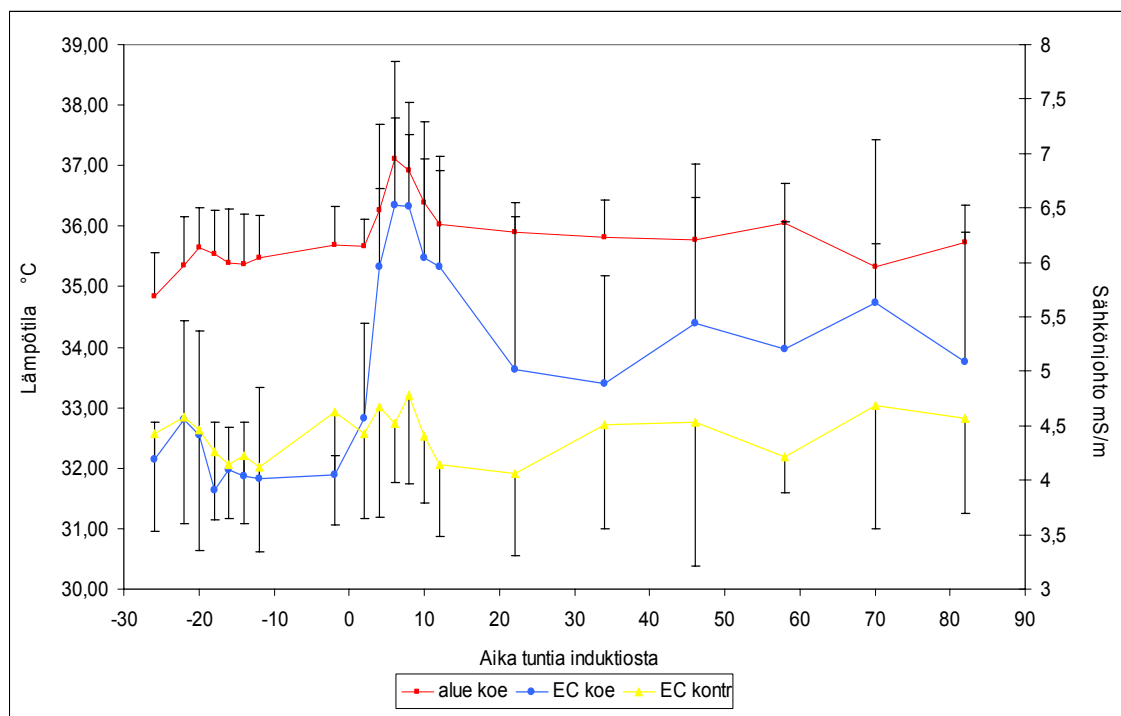
Alue koe = koeneljänneksen utareen pinnan keskilämpötila alueelta, joka piirrettiin kuviin manuaalisesti kameran toimintoja hyväksi käyttäen. 40 × 40 pikselin kokoinen ympyrä alkoi vetimen juuresta ja sijoittui keskelle maitokammion alaosaan.

Lämpökamerakuvat on otettu lateraalisuunnasta.

### 3.3.5 Maidon sähköjohtokyky

Maidon sähköjohtokyky mitattiin käsikäyttöisellä mittarilla, mikä osoittautui hyvin hankalaksi. Maidon vaahtoisuus ja pieninkin liike anturissa vaikutti mittaustulokseen paljon. Maidon sähköjohtokyky koeneljänneksessä verrattuna kontrollineljännekseen

nousi 2 h ( $p < 0,001$ ) induktion jälkeen ja saavutti huippuarvonta (6,5 mS/m) 6 h induktiosta. Sähkönjohtokyky pysyi lähtötasoa korkeammalla tutkimusjakson loppuun saakka, mikä korreloi hyvin kokonaissolupitoisuuden kanssa. Myös kontrollineljänneksessä oli suuria vaihteluja yksittäisten mittausten välillä, mutta yhteyttä koeneljänneksen reaktioon ei havaittu ja keskiarvo pysyi viitearvojen puitteissa. Koeneljänneksen EC ei poikennut tilastollisesti merkitsevästi kontrollineljänneksen EC-arvosta mittauskohdissa 34 h ja 82 h induktiosta. Kontrollineljänneksen EC palautui hitaasti normaalitasoa kohden ollen vielä 70 h induktiosta tilastollisesti merkitsevästi koholla ( $p < 0,05$ ).

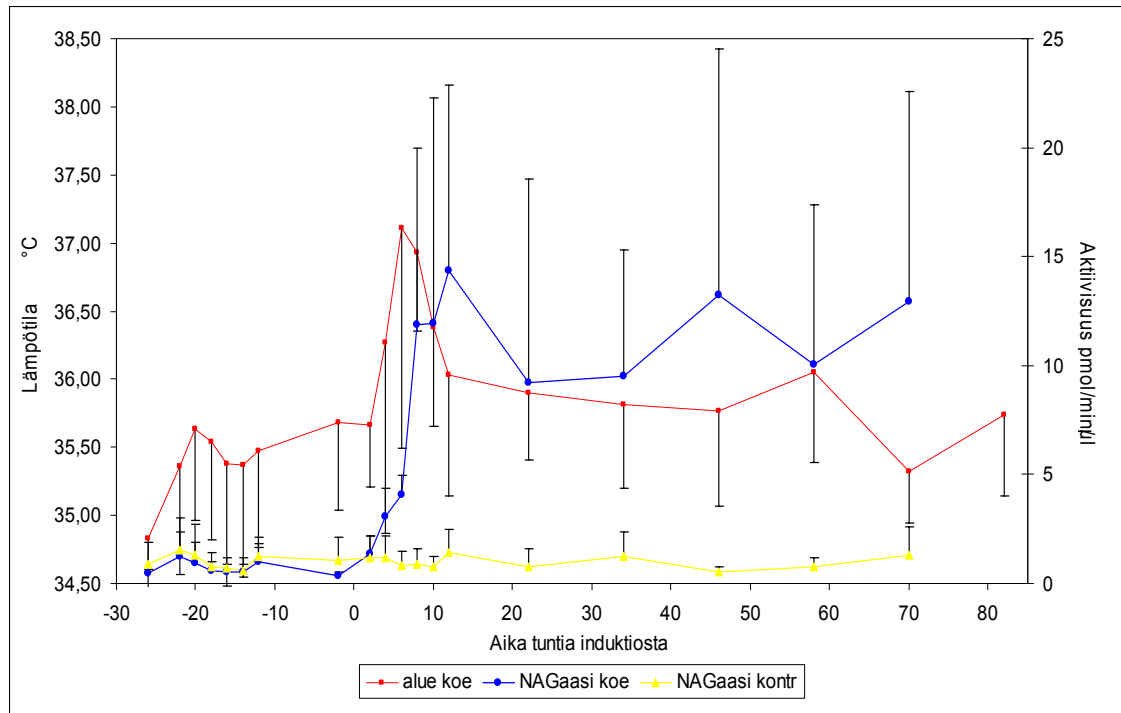


Kuva 3. Kuuden koelehmän maidon sähkönjohtokyvyn keskiarvo (EC) koe - ja kontrollineljänneksissä koko koejakson ajalta. Kuvaajiin on merkitty keskihajonnat. *E. coli* endotoksiini indusoiitiin hetkellä 0.

Alue koe = koeneljänneksen utareen pinnan keskilämpötila alueelta, joka piirrettiin kuviin manuaalisesti kameran toimintoja hyväksi käyttäen. 40 × 40 pikselin kokoinen ympyrä alkoi vetimen juuresta ja sijoittui keskelle maitokammion alaosaan. Lämpökamerakuvat on otettu lateraalisuunnasta.

### 3.3.6 NAGaasi

NAGaasiaktiivisuus lähti verrattuna kontrollineljänneksen nousemaan 8 h induktiosta ( $p < 0,001$ ), saavutti huippuarvonsa 12 h induktiosta ja pysyi korkealla tutkimusjakson loppuun saakka. Jakson viimeiset näytteet päivän 3 iltana jäivät ottamatta ja puuttuvat sen vuoksi. Kontrollineljänneksessä ei havaittu NAGaasipitoisuuden nousua.



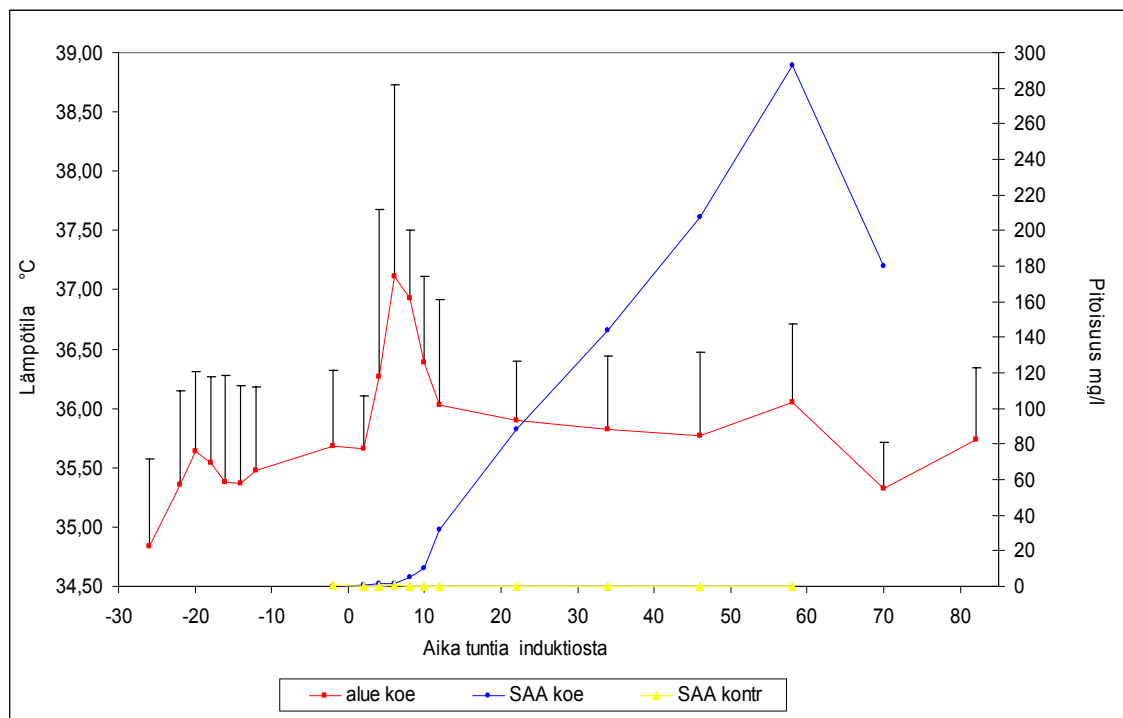
Kuva 4. Kuuden koelehmän maidon NAGaasi-aktiivisuuden keskiarvo (NAGaasi) koe- ja kontrollineljänneksissä koko koejakson ajalta. Kuvaajiin on merkitty keskihajonnat. *E. coli* endotoksiini indusoiitiin hetkellä 0.

Alue koe = koeneljänneksen utareen pinnan keskilämpötila alueelta, joka piirrettiin kuviin manuaalisesti kameran toimintoja hyväksi käyttäen.  $40 \times 40$  pikselin kokoinen ympyrä alkoi vetimen juuresta ja sijoittui keskelle maitokammion alaosaan. Lämpökamerakuvat on otettu lateraalisuunnasta.

### 3.3.7 SAA

Koeneljänneksen maidon SAA-pitoisuudet suurenevät verrattuna kontrollineljänneksen lievästi 8 h induktiosta. Lehmäkohtainen vaihtelu oli erittäin suurta, mutta pitoisuuden keskiarvo suureni tasaisesti kohden tutkimuskauden loppua. Viimeinen näyte päivän 3

iltana jäi ottamatta, joten arvot puuttuvat. Korkein keskiarvo 300 mg/l mitattiin 58 h induktiosta. SAA-pitoisuuksista ei tehty tilastollista testausta.



Kuva 5. Kuuden koelehmän maidon SAA-pitoisuuden keskiarvo (SAA) koe - ja kontrollineljänneksissä koko koejakson ajalta. Kuvaajiin on merkitty keskihajonnat. *E. coli* endotoksiini indusoiitiin hetkellä 0.

Alue koe = koeneljännesten utareen pinnan keskilämpötila alueelta, joka piirrettiin kuviin manuaalisesti kameran toimintoja hyväksi käyttäen. 40 × 40 pikselin kokoinen ympyrä alkoi vetimen juuresta ja sijoittui keskelle maitokammion alaosaan. Lämpökamerakuvat on otettu lateraalisuunnasta.

### 3.3.8 Maitomäärä

Maitomäärissä ei tapahtunut keskiarvallisesti suuria muutoksia, mutta lehmäkohtaiset vaihtelut olivat suuria. Normaaliksi maidontuotokseksi otettiin induktiota edeltävän päivän tuotokset. Suurin muutos oli päivänä 1, jolloin maitomäärän keskiarvo oli pudonnut 13 %. Koeneljännksen kokonaismaitomäärä pieneni eniten toisena päivänä induktion jälkeen. Yhdellä lehmällä maidontuotanto lisääntyi ollen suurimmillaan päivänä

1, jolloin maitomäärä lisääntyi 30 %. Lehmien keskimääräinen maidontuotanto ei palautunut alkuperäiselle tasolle tutkimusjakson aikana.

### 3.4 Pohdinta

#### 3.4.1 Endotoksiinimalli

Kokeellinen endotoksiinimalli toimi hyvin ja kaikille tutkimuksen lehmille kehittyi kliinisen utaretulehduksen oireet. Näin on havaittu aiemmissakin tutkimuksissa [23, 35, 41]. Ennen paikallis- tai yleisoireita havaittiin käyttäytymisen muutos: lehmät olivat levottomia ja osa potkiskeli utaretaan. Yleisoireet olivat selkeät jo 2 h induktiosta; lehmät olivat apaattisempia ja kuumeisia. Kuten aiemmissakin tutkimuksissa, joissa on käytetty endotoksiinimallia, yleisvointi palautui normaaliksi 24 h tunnin kuluessa induktiosta [35, 51, 65]. Paikallisoireet ilmenivät lievinä 2 h ja vakavina 4 h induktiosta. Koeneljänneksen turvotus, kuumotus ja kipu näkyivät ennen kuin maidossa havaittiin muutoksia. Maitomuutokset havaittiin 2-4 h induktiosta ja ne säilyivät 4 lehmällä tutkimusjakson loppuun saakka. Mehrzad ym. (2001) havaitsivat maidossa hiutaleisuutta ja hyytymiä 3-6 h induktiosta.

Tutkimuksessamme käytetty endotoksiiniannos 10 µg oli pienempi kuin useimmissa aiemmissa tutkimuksissa käytetyt 100 µg [35, 41, 51] ja 500 µg [23]. Vain muutamia tutkimuksia on tehty pienemmillä endotoksiiniannoksilla, eikä niissä ole kuvattu utareen paikallisoireiden palautumisaikataulua [1, 64, 65]. Tutkimuksessamme utareen paikallisoireet ja maitomuutokset eivät palautuneet 84 h sisällä induktiosta. Useissa aiemmissa tutkimuksissa suuremmalla endotoksiiniannoksella utareen muutokset tai paikallisoireet ovat palautuneet normaaliksi nopeammin [23, 35, 41, 65]. Mehrzad ym. (2001) tutkimuksessa kaikki kliinisen utaretulehduksen oireet olivat kadonneet 72 tunnin kuluessa induktiosta.

Kokonaismaitomäärä pieneni eniten induktiosta seuraavana päivänä eikä tutkimusjakson aikana palautunut enää aiemmalle tasolle. Tämä voi johtua siitä, että koelehmät olivat loppulypsykaudella ja lähellä umpeen menoa. Koeneljänneksen kokonaismaitomäärä pieneni eniten toisena päivänä induktion jälkeen. Myös Lehtolainen ym. (2003) ja

Hoeben ym. (2000) totesivat voimakkaan maitomäärän vähenemisen, mutta heidän tutkimuksissaan maidontuotos palautui normaalille tasolle induktiota seuraavana päivänä

Maidon tulehdusindikaattoreista reagoi nopeammin SCC, joka verrattuna kontrollineljännekseen oli kohonnut 4 h kuluttua induktiosta saavuttaen huippuarvon 34 h kuluttua. Myös CMT-testillä reaktio havaittiin 4 h kuluttua induktiosta. Kokonaissolumäärä pysyi suurena tutkimusjakson loppuun saakka. Kontrollineljänneksissä ei todettu muutoksia. Tulehdusvälittäjäaineet houkuttelevat utarekudokseen verenkierrosta neutrofiilejä granylosyyttejä, jotka muodostavatkin tulehdusmaidon somaattisista soluista suuren osan [55]. Perkins ym. (2002) totesivat myös SCC:n voimakkaan kasvun 3 h induktiosta; perustaso saavutettiin noin 7 päivän kuluttua. Ajallisesti SCC korreloi melko hyvin utareen pintalämpötilan muutoksen kanssa; molemmissa todettiin tilastollisesti merkitsevä muutos 4 tuntia induktiosta.

EC-mittauksen tasot vastasivat aiemmissa tutkimuksissa normaalissa ja tulehdusmaidossa todettuja tasoja [4, 7, 47]. Utareen pintalämpötilan muutokseen verrattuna EC-muutos korreloi hyvin; tilastollisesti merkitsevä muutos havaittiin molemmissa 4 tuntia induktiosta ja huippuarvo saavutettiin 6 tuntia induktiosta. Koeneljänneksen EC-arvo pysyi perustasoa korkeampana ( $p < 0,05$ ) tutkimusjakson loppuun saakka, mikä korreloi hyvin maitomuutosten ja SCC:n kanssa, mutta se ei ollut kontrollineljännekseen verrattuna suurempi mittaushetkillä 34 h ja 82 h induktiosta.

NAGaasiaktiivisuus alkoi nousta 8 h induktiosta verrattuna kontrollineljännekseen ja huippuarvo saavutettiin 12 h kuluttua induktiosta. Aktiivisuus ei palautunut tutkimusjakson aikana normaalille tasolle. NAGaasiaktiivisuuden nousu kuvastaa utarekudoksessa tapahtunutta tuhoa, koska NAGaasia vapautuu myös utaresolujen tuhoutuessa [30]. NAGaasiaktiivisuuden nousu korreloi somaattisten solujen kokonaismäärän kanssa, mikä on loogista, koska tulehdusmaidossa neutrofiilisten granylosyyttien määrä lisääntyy voimakkaasti ja NAGaasia vapautuu niiden fagosytoosin ja solunjakautumisen aikana [56]. NAGaasiaktiivisuus nousi tilastollisesti merkitsevästi 8 tuntia induktiosta kun taas utareen pintalämpötilassa havaittiin merkittävä muutos jo 4 tuntia induktiosta. NAGaasiaktiivisuus nousi siis selkeästi hitaammin kuin utareen pintalämpötilan muutos.

Maidon SAA-pitoisuus suureni verrattuna kontrollineljännekseen lievästi jo 4 h induktiosta, mutta korkein keskiarvo saavutettiin vasta 58 h kuluttua. Lehtolainen ym. (2003) havaitsivat SAA pitoisuuden alkavan suurentua 8 h induktiosta saavuttaen huippuarvonsa 32 h induktiosta. He havaitsivat myös, että maidon SAA-pitoisuus suureni nopeammin kuin seerumin. Tämä viittaa myös utareperäiseen tuotantoon, vaikka SAA tuotetaan suuressa osassa maksassa [15, 23, 36]. Myös Lehtolainen ym. (2003) tutkimuksessa lehmäkohtaiset vaihtelut olivat huomattavan suuria, mikä johtuu lehmien yksilöllisestä reagoinnista tulehdukseen. Utareen lämpötilan muutoksella ja SAA-pitoisuuden nousulla ei ollut ajallista yhteyttä. SAA-pitoisuus suureni selkeästi hitaammin kuin utareen pintalämpötila.

#### 3.4.2 Lämpökamera

Lämpökamerakuvista todettiin voimakas positiivinen korrelaatio koe- ja kontrollineljänneksen ihon pinnan lämpötilan sekä rektaalilämmön välillä eli kamera mittasi käytännössä lehmän yleislämpöä. Lämpökameran avulla havaittiin lämpötilan muutos utareen pinnalla 4 h induktiosta, huippuarvo saavutettiin 6 h induktiosta ja normaalitaso saavutettiin 24 h kuluessa aivan kuten rektaalilämmölläkin. Vastaavat muutokset havaittiin myös kontrollineljänneksessä. Aiempia tutkimuksia utareen ihon lämpötilan mittauksesta utaretulehduksen aikana on tehty vähän. Scott ym. (2000) havaitsivat selkeän nousun utareen ihon lämpötilassa jo tunnin kuluttua endotoksiini-induktiosta, mutta myös heidän tutkimuksessaan kontrollineljänneksenkin lämpötila kohosi.

Tutkimuksessamme perusolettamuksena oli, että tulehdusreaktio lisää aluksi paikallisesti koeneljänneksessä verenkiertoa ja siten utareen ihon säteilemää lämpöä. Paikallista tulehdusta ei kuitenkaan havaittu lämpökameran avulla, mikä voi osittain selittyä koeneljänneksen voimakkaalla turvotuksella. Tulehdusreaktiossa verisuonten läpäisevyys lisääntyy ja plasmaa pääsee valumaan verisuonista kudospöytätilaan. Voimakas turvotus voi jopa heikentää tulehdusalueen verenkiertoa. Toisaalta tulehdusvälittäjäaineista prostaglandiinit aiheuttavat kapillaarisuonten laajenemisen [55]. Myös kuumeeseen aiheuttama vasokonstriktio voi olla osatekijänä paikallisoireiden heikossa havaitsemisessa. Utarekudoksen makrofagien tuottamat endogeeniset pyrogeenit kulkeutuvat verenkierron mukana hypothalamuksen lämpösäätelykeskukseen. Lämmönsäätelykeskus alkaa nostaa

elimistön lämpötilaa lisäämällä metaboliaa ja aiheuttamalla lihasväristyksiä. Ääreis- ja pintaverenkiertoa vähennetään vasokonstriktion kautta ja hikoilu lakkaa [55].

Kokeen tarkoituksena oli selvittää soveltuisiko lämpökamera avuksi kliinisen utaretulehduksen varhaiseen havaitsemiseen. Lämpökameran avulla havaittiin kyllä lämpötilan muutos utareessa, mutta ei ennen kuumeen nousua alkanutta paikallistulehdusta eikä kuumeen jälkeen utareessa jatkunutta tulehdusprosessia. Tämän tutkimuksen perusteella lämpökamera ei sovellu käytettäväksi utaretulehduksen havaitsemisessa ainakaan sellaisenaan. Lehmien käyttäytymisen, paikallisoireiden, maidon koostumuksen ja maidosta mitattavien tulehdusmuutosten avulla utaretulehdus havaittiin nopeammin kuin lämpökameran avulla. Utareen paikallismuutokset, maidon koostumus sekä maidosta mitattavat tulehdusmuutokset kuvasivat myös paremmin paranemisprosessia. Lämpökamera voisi soveltua ns. kaukolämpömittariksi, joka toimisi muiden diagnostisten menetelmien rinnalla utaretulehduksen ja myös muiden kuumetta aiheuttavien sairauksien havaitsemisen apuna. Lisätutkimuksia tarvittaisiin selvittämään, pystyisikö lämpökameran avulla havaitsemaan paikallisesti lisääntyneen verenkierron ja siitä johtuvan lämpötilan nousun spontaanissa/luonnollisessa utaretulehduksessa, jossa tulehdusreaktio alkaa hitaammin ja myös varsinainen tulehdusprosessi jatkuu pidempään.

Aiemmissä tutkimuksissa on saatu kannustavia tuloksia paikallisten tulehdusten havaitsemisesta lämpökameran avulla. Lämpökameran avulla on pystytty havaitsemaan varhaisessa vaiheessa sorkkakuume, paikalliset kuumat ja kylmät pisteet selistään kipeiden hevosten lihaksissa ja sidekudoksissa sekä ontuvilla hevosilla tulehdusprosessin aiheuttamat lämpötilamuutokset jalkojen luissa, nivelissä, jänteissä, lihaksissa sekä kavioissa [16, 18, 46]. Myös indusoidusta utaretulehdusmallista on saatu aiemmissä tutkimuksissa kannustavampia tuloksia [60].

Tutkimuksessamme lehmien käyttäytymisen muutos eli levottomuus ja utareen potkiminen havaittiin ennen paikallisoireita tai maitomuutoksia. Tämä herätti ajatuksia sovelutuksesta, jossa esim. aktiivisuus toimisi yhtenä tekijänä eläinten hyvinvointia havainnoivissa järjestelmissä.

### 3.5 Yhteenveto

Utaretulehdus havaittiin ensimmäisenä lehmien käyttäytymisen avulla. Lehmät potkivat utaretaan ja olivat levottomia jo tunnin kuluttua endotoksiini-induktiosta. Kahden tunnin kuluttua induktiosta havaittiin yleisoireet (kuume, apaattisuus) ja paikallisoireet (utareen turvotus, kuumotus, kipu). Maidon koostumus alkoi muuttua koeneljänneksessä 2-4 kuluttua induktiosta. Maidosta mitattavista tulehdusmuutoksista ensimmäisenä alkoi suurentua somaattisten solujen kokonaismäärä; CMT-testillä ja SCC-määrityksellä muutos verrattuna kontrollineljännekseen havaittiin neljän tunnin kuluttua induktiosta. Neljän tunnin kuluttua induktiosta havaittiin tilastollisesti merkitsevä suureneminen verrattuna kontrollineljänneksiin lämpökamerakuvien lämpötiloissa ja maidon sähköjohtokyvyssä. Maidon SAA-pitoisuus ja NAGaasiaktiivisuus alkoi suurentua kahdeksan tunnin kuluttua induktiosta. Lämpökamera toimi yleislämpömittarina eikä sen avulla havaittu utarekudoksen paikallista tulehdusprosessia. Lämpökamera sopii avuksi minkä tahansa kuumeisen sairauden, mm. kuumeisen utaretulehduksen, havaitsemiseen. Suurinta mielenkiintoa herätti lehmien käyttäytyminen ja sen hyödyntäminen tulevaisuudessa eläinten hyvinvointia havainnoivissa järjestelmissä.

#### 4 Kiitokset

Lämmin kiitos syventävien opintojeni valvojalle Satu Pyörälälle, ohjaajille Suvi Taposelle ja Mari Hoviselle, arvostelijalle Laura Hänniselle sekä opponijalle Hanne-Maarit Rantaselle.

## 5 Läheteet

- [1] Anderson, K. L., Hunt, E. 1989. Anti-inflammatory therapy in acute endotoxin-induced bovine mastitis. *Vet. Res. Com.* 13:17-26.
- [2] Ball, H. J., Greer, D. 1991. N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase test for screening milk samples for subclinical mastitis. *Vet. Rec.* 129:597-509.
- [3] Bansal, B. K., Hamann, J., Grabowski, N. T., Singh, K. B. 2005. Variation in the composition of selected milk fraction samples from healthy and mastitic quarters, and its significance for mastitic diagnosis. *J. Dairy Res.* 72:144-152.
- [4] Barth, K., Worstorff, H. 2003. Monitoring of quarter health status by periodic milk conductivity measurement: a useful management tool in dairy herds. *Fifth Internat. Dairy Housing Proceed.*, January 2003, pp 84-90.
- [5] Barth, K. 2000. Basic investigations to evaluate a highly sensitive infrared-thermograph-technique to detect udder inflammation in cows. *Milchwissenschaft* 55:607-609.
- [6] Berry, R. J., Kennedy, A. J., Scott, S. L., Kyle, B. L., Schaefer, A. L. 2003. Daily variation in the udder surface temperature of dairy cows measured by infrared thermography: Potential for mastitis detection. *Can. J. Anim. Sci.* 83:687–693.
- [7] Bruckmaier, M. R., Weiss, D., Wiedemann, M., Schmitz, S., Wendl, G. 2004. Changes of physicochemical indicators during mastitis and the effects of milk ejection on their sensitivity. *J. Dairy Rec.* 71:316-321.
- [8] Burvenich, C., Van Merris, V., Mehrzad, J., Diez-Fraile, A., Duchateau, L. 2003. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet. Res.* 34:521–564.

- [9] Chagunda, M. G. G., Larsen, T., Bjerring, M., Ingvarsen, K. L. 2006. L-lactate dehydrogenase and N-acetyl-*b*-D-glucosaminidase activities in bovine milk as indicators of non-specific mastitis. *J. Dairy Res.* 73:431-440.
- [10] Cullor, J. S., Smith, W. L. 1996. Endotoxin and disease in food animals. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.* 18:S31-S38.
- [11] de Mol, R. M., Ouweltjes, W. 2001a. Detection model for mastitis in cows milked in an automatic milking system. *Pre. Vet. Med.* 49:71-82.
- [12] de Mol, R. M., Ouweltjes, W., Kroeze, G. H., Hendriks, M. M. W. B. 2001b. Detection of estrus and mastitis: field performance of a model. *App. Engin. Agric.* 17:399-407.
- [13] de Mol, R. M., Wodlt, W. E. 2001c. Application of fuzzy logic in automated cow status monitoring. *J. Dairy Sci.* 84:400-410.
- [14] Eckersall, P. D., Young, F. J., McComb, C., Hogarth, C. J., Safi, S., Wber, A., McDonald, T., Nolan, A. M. and Fitzpatrick, J. L. 2001. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. *Vet. Rec.* 148:35-41.
- [15] Eckersall, P. D., Young, F. J., Nolan, A. M., Hogarth, C. J., Knight, C. H., McComb, C., Waterson, M. M., Hogarth, C. J., Scott, E. M., Fitzpatrick, J. L. 2006. Acute phase proteins in bovine milk in a experimental model of *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 89:1488-1501.
- [16] Eddy, A. L. van Hoogmoed, L. M., Snyder, J. R. 2001. The role of thermography in the management of equine lameness. *Vet. J.* 162:172-181.
- [17] Espada, E. and H. Vijverberg. 2002. Milk colour analysis as tool for the detection of abnormal milk. In: *Proc. First North American Conference on Robotic Milking*, March 20-22, Toronto, Canada, IV-28-IV-38. Wageningen Press, The Netherlands.

- [18] Fonseca, B. P. A., Alves, A. L. G., Nicoletti, J. L. M., Thomassian, A., Hussni, C. A., Mikail, S. 2006. Thermography and ultrasonography in back pain diagnosis of equine athletes. *J. Equine Vet. Sci.* 26:507-516.
- [19] Heegaard, P. M. H., Godson, D. L., Toussaint, M. J. M., Tjørnehøj, K., Larsen, L. E., Viuff, B., Rønsholt, L. 2000. The acute phase response of haptoglobin and serum amyloid A (SAA) in cattle undergoing experimental infection with bovine respiratory syncytial virus. *Vet. Immunol. Immunopath.* 77:151-159.
- [20] Hillerton, J. E. 2000. Detecting mastitis cow-side. *Nation. Mastitis Counc. Ann. Meeting Proceed.*
- [21] Hirvonen J, Pyörälä S, Jousimies-Somer H. 1996. Acute phase response in heifers with experimentally induced mastitis. *J. Dairy Res.* 63:351-360.
- [22] Hirvonen J, Eklund K, Teppo A. M., Huszenicza, G., Kulcsar, M., Saloniemi, H., Pyörälä, S. 1999. Acute phase response in dairy cows with experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. *Acta. Vet. Scand.* 40: 35-46.
- [23] Hoeben, D., Burvenich, C., Trevisi, E., Bertoni, G., Hamann, J., Bruckmaier, R.M., Blum, J.W. 2000. Role of endotoxin and TNF-alpha in the pathogenesis of experimentally induced coliform mastitis in periparturient cows. *J. Dairy Res.* 67:503-514.
- [24] Hogan, J. and Smith, K.L. 2003. Coliform mastitis. *Vet. Res.* 34:507-519.
- [25] Honkanen-Buzalski, T., Seuna, E. 1995. Isolation and identification of pathogens from milk. In: Sandholm, S., Honkanen-Buzalski, T., Kaartinen, L., Pyörälä, S. (Eds), *The bovine udder and mastitis.* Gummerus, Jyväskylä, pp 121-141.
- [26] Hovinen, M., Aisla, A-M., Pyörälä, S. 2006. Accuracy and reliability of mastitis detection with electrical conductivity and milk colour measurement in automatic milking. *Acta Agric. Scand. Section A*, 56:121-127.

- [27] <https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/www/Palvelut/Vihdin%20palvelut/Maitokone%20Oppaat%20ja%20ohjeet/AMStilanne2007.pdf>
- [28] Jones, B. F., and Plassmann, P. 2002. Digital infrared thermal imaging of human skin. *IEEE Engineering in Medicine and Biology* 21: 41-48.
- [29] Kaartinen, L., Kuosa, P.L., Veijalainen, K., Sandholm, M. 1988. Compartmentalization of milk N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAGase) by storage. Freezing and thawing, detergent and using cell stimulants, *J. Vet. Med. B.* 35:408–414.
- [30] Kitchen, B. J., Middleton, G., Salmon, M. 1978. Bovine milk N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase and its significance in the detection of abnormal udder secretions. *J. Dairy Res.* 45:15-20.
- [31] Kitchen B. 1981. Review of the progress of dairy science: Bovine mastitis: Milk compositional changes and related diagnostic tests. *J. Dairy Res.* 48:167-188.
- [32] Kitchen B., Kwee W.S., Middleton G., Andrews R. J. 1984. Relationship between the level of N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAGase) in bovine milk and the presence of mastitis pathogens. *J. Dairy Res.* 51:11–16.
- [33] Klastrup, O. 1975. Scandinavian recommendations on examination of quarter milk samples. *Int. Dairy Fed. Annu. Bull.* 85:49.
- [34] Koivula, M., Pitkälä, A., Pyörälä, S., Mäntysaari, E. 2007. Distribution of bacteria and seasonal and regional effects in a new database for mastitis pathogens in Finland. *Acta Agric. Scand. Section A*, 57: 89-96.
- [35] Lehtolainen, T., Suominen, S., Kutila, T., Pyörälä, S. 2003. Effect of intramammary *Escherichia coli* endotoxin in early- vs. late-lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:2327-2333.
- [36] Lehtolainen, T., Røntved, C.M., Pyörälä, S. 2004. Serum amyloid A and TNF2 $\alpha$  in serum and milk during experimental endotoxin mastitis. *Vet. Res.* 35:651-659.

- [37] Lehtolainen, T. *Escherichia coli* mastitis. 2004. Bacterial factors and host response. *Väitöskirja* University of Helsinki, Faculty of veterinary medicine, Yliopistopaino, Helsinki.
- [38] Lohuis, J. A. C. M., Verheijden, J. H. M., Burvenich, C., van Miert, A. S. J. 1988. Patophysiological effects of endotoxins in ruminants. *Vet. Quart.* 10: 109-125.
- [39] Mattila T., Sandholm M. 1986. Antitrypsin and N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase as markers of mastitis in a herd of Ayshire cows. *Am. J. Vet. Res.* 46:2453-2456.
- [40] McDonald T. L., Larson, M. A., Mack, D. R., Weber, A. 2001. Elevated extra-hepatic expression and secretion of mammary-associated serum amyloid A 3 (M-SSA3) into colostrums. *Vet. Immunol. Immunopath.* 83:203-211.
- [41] Mehrzad, J., Dosogne, H., Meyer, E., Burvenich, C. 2001. Local and systemic effects of endotoxin mastitis on the chemiluminescence of milk and blood neutrophils in dairy cows. *Vet. Res.* 32:131-144.
- [42] Mottram, T., Rudnitskaya, A., Legin, A., Fitzpatrick, J. L., Eckersall, P. F. 2007. Evaluation of a novel chemical sensor system to detect clinical mastitis in bovine milk. *Biosensors and Bioelectronics* 22:2689-2693.
- [43] Nielen M, Deluyker H., Schukken Y., Brand, A. 1992. Electrical conductivity of milk: measurement, modifiers, and meta-analysis of mastitis detection performance. *J. Dairy Sci.* 75: 606–614.
- [44] Nielen M., Schukken Y.H., Brand A. 1995. Detection of subclinical mastitis from on-line milking parlor data. *J. Dairy Sci.* 78:1039–1049.
- [45] Nielsen, B. H., Jacobsen, S., Andersen, R. H., Niewold, T. A., Heegaard, P. M. H. 2004. Acute phase protein concentrations in serum and milk from healthy cows, cows with clinical mastitis and cows with extramammary inflammatory conditions. *Vet. Rec.* 154:361-365.

- [46] Nikkhah, A., J. C. Plaizier, M. S. Einarson, R. J. Berry, S. L. Scott and A. D. Kennedy. 2005. Infrared thermography and visual examination of hooves of dairy cows in two stages of lactation. *J. Dairy Sci.* 88:2749-2753.
- [47] Norberg, E., Hogeveen, H., Korsgaard, I. R., Friggens, N. C., Sloth, K. H. M. N., Løvendahl, P. 2004. Electrical Conductivity of Milk: Ability to predict mastitis status. *J. Dairy Sci.* 87:1099–1107.
- [48] Olsson, N. C., Hellyer, P. W., Dodam, J. R. 1995. Mediators and vascular effects in response to endotoxin. *Br. Vet. J.*, 151:489-522.
- [49] Osterås, O. 2005. Economic consequences of mastitis. *Bull. Intern. Dairy Fed.* p 394.
- [50] Ouweltjes, W. and H. Hogeveen. 2001. Detecting abnormal milk through colour measuring. *Natl. Mastitis Council Ann. Meet.* 40:217-219.
- [51] Perkins, K. H., VandeHaar, M. J., Burton, J. L., Liesman, J. S., Erskine, R. J., El-sasser, T. H. Clinical responses to intramammary endotoxin infusion in dairy cows subjected to feed restriction. 2002. *J. Dairy Sci.* 85:1724-1731.
- [52] Pyörälä, S. (2003) Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Vet. Res.* 34:565-578.
- [53] Rasmussen, M. D. 2004. Detection and separation of abnormal milk in automatic milking systems. From: *Automatic milking - a better understanding: Proceeding of the International Symposium, Wageningen, Academic Publishers, The Netherlands.*
- [54] Ruegg P.L., Reinemann D.J. 2002. Milk quality and mastitis tests. *Bov. Pract.* 36:41–54.

- [55] Sandholm, M. 1995. Inflammation in mastitis. In: Sandholm, M., Honkanen-Buzalski, T., Kaartinen, L., Pyörälä, S. (Eds.), *The bovine udder and mastitis*. Gummerus, Jyväskylä, pp. 59-75.
- [56] Sandholm, M. 1995. Detection of inflammatory changes in milk. In: Sandholm, M., Honkanen-Buzalski, T., Kaartinen, L., Pyörälä, S. (Eds.), *The bovine udder and mastitis*. Gummerus, Jyväskylä, pp. 89-104.
- [57] Sandholm, M., Pyörälä, S. 1995. Coliform mastitis. In: Sandholm, M., Honkanen-Buzalski, T., Kaartinen, L., Pyörälä, S. (Eds.), *The bovine udder and mastitis*. Gummerus, Jyväskylä, pp. 149-160.
- [58] Sargeant, J. M., Leslie, K. E., Shirley, J. E., Pulkrabek, B. J., Lim, G. H. 2001. Sensitivity and specificity of somatic cell count and California Mastitis Test for identifying intramammary infection in early lactation. *Am. Dairy Sci. Ass.* 84:2018-2024.
- [59] Schaefer, A. L., Cook, N., Tessaro, S. V., Deregt, D., Desroches, G., Dubeski, P. L., Tong, A. K. W., Godson, D. L. 2004. Early Detection and Prediction of Infection Using Infrared Thermography. *Can. J. Anim. Sci.* 84:73-80.
- [60] Scott, S. L., Schaefer, A. L., Tong, A. K. W., Lacasse, P. 2000. Use of infrared thermography for early detection of mastitis in dairy cows. *Can. J. of Anim. Sci.* 80: 764-765 (Abstracts of Technical Papers)
- [61] Steward, M., Webster, J. R., Shaefer, A. L., Cook, N. J., Scott, S. L. 2005. Infrared thermography as a non-invasive tool to study animal welfare. *Anim. Welfare* 14:319-325.
- [62] Tsenkova, R., Atanassova, S., Toyoda, K., Ozaki, Y., Itoh, K., Fearn, T. 1999. Near-infrared spectroscopy for dairy management: measurement of unhomogenized milk composition. *J. Dairy Sci.* 82:2344–2351.
- [63] Tsenkova, R., S. Atanassova, S. Kawano, and K. Toyoda. 2001. Somatic

cell count determination in cow's milk by near-infrared spectroscopy: A new diagnostic tool. *J. Anim. Sci.* 79:2550–2557.

[64] Weiss, W. P., Hogan, J. S. 2005. Effect of selenium source on selenium status, neutrophil function, and response to intramammary endotoxin challenge of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 88:4366–4374.

[65] Werner-Misof, C., Macuhova, J. Tancin, V., Brucmaier, R. M. 2007. Dose dependent changes in inflammatory parameters in the milk of dairy cows after inflammatory infusion of lipopolysaccharide. *Vet. Med.* 52:95-102.

[66] Whyte, D.S., Orchard, R. G., Cross, P. S., Frietsch, T., Claycomb, R. W., Mein, G. A. 2004. An on-line somatic cell count sensor. pp. 235-40 From: *Automatic milking - a better understanding: Proceedings of the International Symposium*, Wageningen Academic Publishers, The Netherlands.

[67] Woolford, M. W., Williamson, J. H., Henderson, H. V. Changes in electrical conductivity and somatic cell count between milk fractions from quarters subclinically infected with particular mastitis pathogens. 1998. *J. Dairy Res.* 65 187-198.

[68] [www.delaval.fi](http://www.delaval.fi)

[69] [www.nhk.fi](http://www.nhk.fi)