

UTICAJ PERIODA LAKTACIJE I ZDRAVLJA NA VREDNOST PARAMETARA U ZBIRNOM UZORKU KRV

THE INFLUENCE OF THE LACTATION PERIOD AND HEALTH ON THE VALUE OF THE PARAMETERS IN THE PULLED BLOOD SAMPLE

Nenad Staničkov^{a*}, Mira Majkić^b, Marko Cincović^b, Radojica Djoković^c,
Miloš Ži. Petrović^c, Sandra Nikolić^b, Siniša Grubač^d

^aSrednja poljoprivredno-prehrambena škola Sombor, Srbija

^bDepartman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, Srbija

^cAgronomski fakultet Čačak, Univerzitet u Kragujevcu, Srbija

^dNaučni institut za veterinarstvo Novi Sad, Srbija

*Autor za kontakt: dr Nenad Staničkov, nenadstanicov@gmail.com



M.M. <https://orcid.org/0009-0007-0110-7327>, M.C. <https://orcid.org/0000-0002-5683-8983>, R.Dj. <https://orcid.org/0000-0003-0900-3227>,
M.Ži.P. <https://orcid.org/0000-0002-4707-6796>, S.N. <https://orcid.org/0000-0001-7337-9937>, S.G. <https://orcid.org/0000-0002-8967-1358>

SAŽETAK

Zbirni uzorci krvi predstavljaju ekonomičan i kvalitetan način da se prikaže stanje određene populacije, kao i odgovor populacije na određene faktore spoljašnje i unutrašnje sredine, upotreba zbirnih uzoraka krvi u veterinarskoj medicini i srodnim oblastima našla je široku primenu, bilo da se radi o dijagnostici zaraznih bolesti, upotrebi uzoraka u internoj kontroli kvaliteta u laboratoriji ili u dijagnostici različitih bolesti. Pravljenje zbirnog uzorka krvi štedi vreme i redukuje cenu analiza, a omogućuje i lakše čuvanje uzorka, dok kod pojedinačnog uzorka trebaju veći prostorni, vremenski i finansijski resursi, uz veći izvor grešaka. U analitičkom smislu veća zapremina zbirnog uzorka (sačinjena od male zapremine većeg broja uzoraka) krvi omogućuje bolje određivanje limita detekcije, dok se u slučaju pojedinačnih uzoraka mora obezbediti dovoljno velika količina tog jednog uzorka. Statističko procenjivajne se takođe razlikuje, tako da kod zbirnog uzorka krvi možemo proceniti srednju vrednosti, ali ne i varijabilnost kao u populaciji pojedinačnih uzoraka. Kao opšte pravilo, srednja vrednost prikupljenih uzoraka treba da bude blizu sredine referentnog opsega da bi se smatrala normalnim. Kriterijumi za tumačenje srednjih vrednosti nisu do kraja definisani. Smatra se da bi dobijena srednja vrednost trebala da budu u rasponu od 1 ili 1,3 standardne devijacije u referentnoj populaciji kako bi mogli da zaključimo da nema jedinki sa značajnim metaboličkim problemima. Nađeno je da ukoliko ima do 10% abnormalnih metaboličkih vrednosti u populaciji imaćemo malo odstupanje vrednosti pula od srednje vrednosti populacije koje će iznositi oko 0,26 standardnih devijacija, ali da to u velikoj meri zavisi od analita koji se meri. Naši rezultati su pokazali da prosečna vrednost pojedinačnih uzoraka krvi i koncentracija dobijena pulovanjem tih pojedinačnih uzoraka daje gotovo identične vrednosti koje se identično menjaju u funkciji perioda laktacije i zdravlja krava. Zbog svega navedenog spravljanje pula uzorka može biti zanimljiv alat u oceni metaboličkog profila na većim populacijama krava.

Ključne reči: krave, metabolički profil, zbirni uzorak krvi.

ABSTRACT

Pooled blood samples are an economical and high-quality way to show the state of a certain population, as well as the response of the population to certain factors of the external and internal environment, the use of pooled blood samples in veterinary medicine and related fields has found wide application, whether it is for the diagnosis of infectious diseases, the use of samples in internal quality control in the laboratory or in the diagnosis of various diseases. Creating a pooled blood sample saves time and reduces the cost of analysis,

and enables easier storage of the sample, while individual samples require greater space, time and financial resources, with a greater source of errors. In the analytical sense, a larger volume of the collective sample (made up of a small volume of a larger number of samples) of blood enables a better determination of the detection limit, while in the case of individual samples, a sufficiently large amount of that one sample must be provided. Statistically estimable also differs, so with a pooled blood sample we can estimate the mean, but not the variability as in a population of individual samples. As a general rule, the mean value of the collected samples should be close to the middle of the reference range to be considered normal. The criteria for the interpretation of mean values have not been fully defined. It is considered that the mean value obtained should be in the range of 1 or 1.3 standard deviations in the reference population in order to be able to conclude that there are no individuals with significant metabolic problems. It was found that if there are up to 10% of abnormal metabolic values in the population, we will have a small deviation of the pool value from the population mean, which will amount to about 0.26 standard deviations, but that it largely depends on the analyte being measured. Our results showed that the average value of individual blood samples and the concentration obtained by pooling those individual samples give almost identical values that change identically as a function of the lactation period and the health of the cows. Due to all of the above, the preparation of pooled samples can be an interesting tool in the evaluation of the metabolic profile of larger cow populations.

Key words: cows, metabolic profile, pooled blood sample.

ZBIRNI UZORCI KRV I PRAKTIČNE SMERNICE ZA FORMIRANJE I INTERPRETACIJU PULEVA KRVNIH SERUMA

Zbirni uzorci krvi predstavljaju ekonomičan i kvalitetan način da se prikaže stanje određene populacije, kao i odgovor populacije na određene faktore spoljašnje i unutrašnje sredine, upotreba zbirnih uzoraka krvi u veterinarskoj medicini i srodnim oblastima našla je široku primenu, bilo da se radi o dijagnostici zaraznih bolesti, upotrebi uzoraka u internoj kontroli kvaliteta u laboratoriji ili u dijagnostici različitih bolesti. Potrebno je poznavati specifičnosti rada sa zbirnim uzorcima uključujući i prednosti i njihova ograničenja (1-6). Pravljenje zbirnog uzorka krvi štedi vreme i redukuje cenu analiza, a omogućuje i lakše čuvanje uzorka, dok kod pojedinačnog uzorka trebaju veći prostorni, vremenski i finansijski resursi, uz veći izvor grešaka. U analitičkom smislu veća zapremina zbirnog uzorka (sačinjena od male zapremine većeg broja uzoraka) krvi omogućuje bolje određivanje limita detekcije, dok se u slučaju pojedinačnih uzoraka mora obezbediti dovoljno velika količina tog jednog uzorka. Statističko procenjivajne se takođe razlikuje, tako da kod zbirnog uzorka krvi možemo proceniti srednju vrednosti, ali ne i varijabilnost kao u populaciji pojedinačnih uzoraka. Potrebno je poznavati osobine uzoraka koji se puluju, kao i parametara koji se u njima mere.

Određivanje biomarkera iz zbirnog uzorka krvi može se sprovoditi u zavisnosti od ciljeva istraživanja i praktičnog značaja istraživanja. Zbirni uzorci krvi su vrlo korisni za procenu relativnih nivoa izloženosti među podpopulacijama ili za praćenje trendova u nivoima tokom vremena ili prostora. Zbirni uzorci krvi podrazumevaju da se određena količina većeg broja uzoraka krvi sabere u jedinstven uzorak i da se određeni parametar meri u jednom zbirnom uzorku, a ne u mnogo pojedinačnih. Zbog prirodne težnje određenih vrednosti da se kreću oko svoje srednje vrednosti, kao mere centralne tendencije (zakon usrednjavanja), zbirni uzorak krvi pokazuje vrednost koja odgovara aritmetičkoj sredini populacije, odnosno aritmetičkoj sredini pojedinačnih uzoraka koji ulaze u sastav zbirnog uzorka krvi. Naši rezultati, bilo da se radi o izmerenim vrednostima ili da se radi o pozicionim vrednostima (Z skor), pokazuju upravo ovu zakonitost. Takođe, poznato je da ako je koncentracija biomarkera normalno raspoređena u populaciji, tada će izmerene koncentracije u više zbirnih uzoraka uzetih iz te populacije takođe biti normalno raspoređene sa istom srednjom vrednošću. Pod idealnim uslovima, i uz jednostavne pretpostavke o normalnosti osnovne distribucije populacije, varijansa populacije može se proceniti na osnovu varijanse u izmerenim koncentracijama u više nezavisno konstituisanih grupa. Međutim, primenu ovog idealnog koncepta ometaju tri faktora: doprinos greške merenja varijacijama u merenjima

objedinjenih uzoraka; doprinos greške objedinjavanja varijacijama merenja objedinjenih uzoraka; i oblik osnovne populacijske distribucije koncentracija biomarkera, koje često ne zauzimaju normalnu distribuciju. Samo prikupljanje uzoraka mogu uvesti poseban i nezavisan izvor greške u analizu, što se naziva „greška u grupisanju“. Greška prikupljanja može biti posebno relevantna za zbirne uzorke koji se sastoje od velikog broja pojedinačnih uzoraka, pri čemu je greška aditivna. Greška u grupisanju proizilazi iz fizičkih grešaka povezanih sa izdvajanjem i prenosom preciznih količina iz više pojedinačnih uzoraka u fizički skup. Greške povezane sa ovim procedurama mogu se pojačati ako se postupak udruživanja oslanja na šemu ponderisanja. Tako je predložena šema objedinjavanja u kojoj je obim uzorka od svakog pojedinca uključenog u zbir proporcionalan statističkoj težini uzorka populacije koja je dodeljena toj osobi. U takvom slučaju, slučajna greška u fizičkom procesu udruživanja može biti uvećana ili izobličena jer će greška u ekstrahovanju ili sastavljanju uzoraka od pojedinaca sa visokom težinom uticati na ukupnu grešku skupa u većoj meri. Kvantifikovanje i karakterizacija ovog izvora greške može zahtevati fizičko eksperimentisanje, gde se proces udruživanja replicira na osnovne rastvore kako bi se procenila relativna veličina ovog izvora greške u poređenju sa drugim potencijalnim izvorima, kao što je greška merenja. Poznati su i statistički pristupi za procenu varijanse populacije i specifičnih percentila na osnovu analize objedinjenih uzoraka. Pristup se oslanja na na tri značajna elementa i to su pretpostavku lognormalnosti u osnovnim podacima; analiza višestrukih grupa da bi se omogućila procena varijanse populacije; i ponovljena analitička određivanja svakog skupa kako bi se omogućila procena varijanse od greške merenja. Na osnovu uočenih varijacija u grupnim merenjima i procene greške merenja, može se proceniti varijansa osnovne populacije. Pouzdanje u procenu osnovne varijanse stanovništva raste sa povećanjem broja grupa iz datih slojeva stanovništva. Slično, tačnost procene greške merenja raste sa povećanjem broja ponovljenih analitičkih određivanja po grupi. Ove procene varijanse u okviru grupe i unutar grupe mogu se kombinovati sa ponderisanom aritmetičkom sredinom izmerenih koncentracija u grupi da bi se procenila i geometrijska sredina i specificirani percentili u populaciji, opet pod pretpostavkom log-normalnosti za distribuciju populacije. Međutim, u meri u kojoj

osnovna distribucija stanovništva odstupa od log normalnosti, ovi pristupi neće pružiti tačne procene varijanse ili distribucije populacije. Zbog svega navedenog je od velikog značaja bilo da se utvrdi oblik i karakteristike distribucije frekvencije zbirnih uzoraka krvi u našem ogledu, gde je precizno utvrđeno koji parametri zauzimaju normalnu raspodelu, a koji parametri ne zauzimaju ovakvu raspodelu. Poređenjem distribucija frekvencija zbirnih uzoraka krvi u odnosu na distribucije pojedinačnih uzoraka krvi zaključujemo da su zbirni uzorci krvi pokazali određeni stepen normalizacije, što se slaže sa predhodno objašnjenim pravilom da zbirni uzorci pokazuju određeni stepen uprosečavanja i sklonosti da dobijene vrednosti idu prema opštoj srednjoj vrednosti kao glavnom pokazatelju centralne tendencije. Kada se izrađuje metabolički profil kod krava on podrazumeva da se određeni broj pojedinačnih krava iz različitih perioda laktacije procenjuje najčešće prostim poređenjem dobijenih vrednosti sareferentnim vrednostima. To mogu biti opšte prihvaćene referentne vrednosti koje su predhodno validirane ili referentne vrednosti zasnovane na stadiu u kom se vrši metaboličko ispitivanje, što bi zapravo bila idealna situacija. Međutim, u određenim okolnostima kada se koristi zbirni uzorak krvi tada se dobija jedinstvena vrednost grupe pa nemamo nikakvih podataka o varijabilnosti. U tom smislu se smatra da je potrebno formirati i referentne vrednosti za pul uzoraka kako bi se adekvatno poredili rezultati pula sa referentnim vrednostima pula, dok prosto poređenje sa referentnim vrednostima za pojedinačne životnje može da dovede do pogrešne klasifikacije i netačne interpretacije zdravstvenog i produktivnog statusa krava. Kod tumačenja prosečnih vrednosti odnosno kod zbirnog uzorka krvi nije dovoljno da se uporedi da li je dobijena vrednost u okviru ili zvan referentnih već je mnogo pravilnije da se poredi dobijena vrednost i njeno variranje u odnosu na centralnu tendenciju referentne populacije, tj. da se poredi udaljenost vrednosti dobijene u pulu od srednje vrednosti referentne populacije. Kada se tumače objedinjeni uzorci, treba imati na umu da izmerena vrednost predstavlja populaciju sa pojedincima iznad i ispod srednje vrednosti. Kao opšte pravilo, srednja vrednost prikupljenih uzoraka treba da bude blizu sredine referentnog opsega da bi se smatrala normalnim. Kriterijumi za tumačenje srednjih vrednosti nisu do kraja definisani. Smatra se da bi dobijena srednja vrednost trebala da budu u rasponu

od 1 ili 1,3 standardne devijacije u referentnoj populaciji kako bi mogli da zaključimo da nema jedinki sa značajnim metaboličkim problemima. Nađeno je da ukoliko ima do 10% abnormalnih metaboličkih vrednosti u populaciji imaćemo malo odstupanje vrednosti pula od srednje vrednosti populacije koje će iznositi oko 0,26 standardnih devijacija, ali da to u velikoj meri zavisi od analita koji se meri. Tako je nađeno da devijacija bila u rasponu od 0,11 za glukozu do 0,6 standardnih devijacija za BHB standardnih devijacija. Nađena je linearna povezanost između broja standardnih devijacija izmerena srednja vrednost ili zbirni uzorak koji se udaljio od srednje vrednosti referentne populacije (ili medijane) i procenta abnormalnih vrednosti unutar grupnog uzorka. Koristeći ove odnose, mogu se generisati smernice za koncentracije analita za interpretaciju srednjih ili zbirnih uzoraka. Ono što nije do sada utvrđeno je kako se ove udaljenosti menjaju u funkciji procenta obolelih krava od neke bolesti, pa je to bila jedna od tema ovog rada. Trenutno su dostupne smernice za tumačenje svežih uzoraka krava. Slične dijagnostičke interpretacije kao što je prethodno opisano mogu se postići sa različitim analitima izmerenim u srednjim ili zbirnim uzorcima. Tako je nađeno da ukoliko je koncentracija albumina u pulu 38,5 g/L nema pojedinačnih uzoraka sa abnormalnim vrednostima, a procentualno učešće abnormalnih uzoraka će biti 20% ako je koncentracija albumina 36,8, odnosno 40% ako je 35,1 g/L. Kada se radi o AST situacija je sledeća: 0% abnormalnih ako je 93,8 IU/L, 20% abnormalnih ako je 99,3 IU/L i 40% abnormalnih uzoraka postojia ako ima 104,7 IU/L. Kod BHB nema abnormalnih uzoraka ako je njegova vrednost 0,52 mmol/L, njihovo učešće je na nivou 20% ukoliko je vrednost 0,9 mmol/L, odnosno 40% ako je vrednost 1,28 mmol/L.

UTICAJ PERIODA LAKTACIJE I ZDRAVSTVENOG STANJA NA KRETANJE PROSEČNE VREDNOSTI POJEDINAČNIH UZORAKA I KONCENTRACIJE DOBIJENE IZ PULA TIH UZORAKA

Upotrebom ANOVA analize smo ispitali razliku pozicione vrednosti (Z-skor) i originalne vrednosti metabolita u zbirnom uzorku krvi kao i dobijenoj aritmetičkoj sredini pojedinačnih uzoraka koji su ušli u pripadajući zbirni uzorak, a koji potiču od krava u ranoj laktaciji, srednjoj laktaciji i od

krava koje pokazuju metaboličke disbalanse u vidu hiperketonemije. ANOVA analiza je pokazala da većina ispitivanih parametara ispoljava statistički značajnu razliku (nivo značajnosti $p < 0,01$ ili veći) u funkciji perioda laktacije i zdravstvenog statusa. Gotovo identično su se ponašali zbirni uzorak krvi, poziciona vrednost zbirnog uzorka krvi, aritmetička sredina pojedinačnih uzoraka koji ulaze u pripadajući zbirni uzorak i poziciona vrednost aritmetičke sredine uzoraka. Jedini parametar koji nije pokazao znake variranja je ukupni protein u krvi (TPROT). Rezultati ANOVA analize su prikazani u Tabeli. Nađeno je značajno odstupanje vrednosti parametara u ketotičnoj grupi krava, dok odstupanje vrednosti metaboličkih parametara kod krava u ranoj i srednjoj laktaciji nije pokazalo statistički značajno odstupanje za najveći broj parametara.

Kada se interpretira vrednost iz zbirnog uzorka krvi ne možemo vršiti direktno poređenje dobijenog rezultata sa referentnom vrednošću za krave. Zbirni uzorak krvi ima jedinstvenu numeričku vrednost koja je zapravo srednja vrednost svih pojedinačnih uzoraka, što znači da će pojedine krave imati vrednosti ispod te vrednosti, odnosno iznad te vrednosti. Ukoliko je srednja vrednost zbirnog uzorka krvi blizu srednje vrednosti referentnog intervala koji koristimo u laboratoriji, velika je verovatnoća da sve krave u pulu uzorka imaju normalne vrednosti. Međutim, odstupanje vrednosti pula uzorka od srednje referentne vrednosti ukazuje na to da postoje krave čije vrednosti odlaze u gornji ili donji ekstrem, povlačeći za sobom srednju vrednost odnosno izmerenu vrednost pula u istom pravcu. Sa druge strane ako je srednja vrednost odnosno koncentracija zbirnog uzorka na npr. donjoj referentnoj vrednosti za kalcijum ili gornjoj referentnoj vrednosti za betahidroksibutirat možemo očekivati da barem 50% krava koje su deo pula ima hipokalcemiju odnosno hiperketonemiju jer se nalaze izvan referentne vrednosti. Međutim, potrebno je utvrditi u kojoj meri samo jedan uzorak u pulu koji zauzima neku ekstremnu vrednost može da poremeti srednju vrednost pula tako da dobijemo pogrešno tumačenje da je mnogo veći broj krava izvan referentnog opsega. Ovo zahteva veliku meta-analizu za koncentraciju metabolita kod krava u zdravlju i bolesti da bi se znalo koje su ti najviše i najniže vrednosti koje su u naučnim rezultatima zabeležene da se mogu sresti kod različitih poremećaja, a potom se mora izvršiti simulacija kako ekstremna vrednost u funkciji broja uzoraka u pulu učestvuje u vrednosti zbirnog uzorka krvi. U

našem radu smo u kontrolisanim uslovima radili na povećanom procentu učešća krava sa ketozom u pulu od deset uzoraka, tako da je jedna do šest krava u pulu imala ketozu i pratili smo pozivione vrednosti zbirnog uzorka za ispitane parametre, koji su pokazalida se značajno menjaju ako ima više od 30% ketoznih krava. Dijagnostička vrednost zbirnog uzorka krvi zavisi od od varijabilnosti metabolita, tako da varijabilni metaboliti sa širokim opsegom srednjih vrednosti, kao što su recimo enzimi jetre pokazuju manju dijagnostičku vrednosti u odnosu na manje varijabilne parametre. Međutim, velika ekstremna odstupanja enzima kod različitih stanja čine enzime ipak dovoljno upotrebljivim za procenu pomoću zbirnog uzorka.

Prilikom analize dobijene vrednosti zbirnog uzorka krvi u obzir se mora uzeti udaljenost vrednost zbirnog uzorka krvi o srednje referentne vrednosti za tu populaciju krava. Udaljenost od srednje vrednosti u okviru referentne vrednosti zapravo predstavlja standardnu devijaciju, a udaljenost predstavlja broj standardnih devijacija od srednje referentne vrednosti. U našem radu smo se rukovali ovom statističkom logikom. Međutim, mi smo u našem radu otišli korak dalje koristeći zapravo Z vrednost. Z vrednost je pozicioni pokazatelj koji je univerzalan i može se primeniti na bilo koji referentni opseg, odnosno distribuciju frekvencije, pa je zbog toga mnogo korisniji u odnosu na vezivanje za standardnu devijaciju. Takođe, kod primene standardne devijacije potrebno je da izračunamo njenu vrednost, idealno u populaciji iz koje potiču uzorci krvi krava, dok je Z vrednost univerzalan vrednost. U ovom radu je nađena linearna veza između Z skora i procenta krava sa ketozom, odnosno Z skora i originalne vrednosti zbirnog uzorka krvi. Nađeno je (7-12) da linearna veza između procenta abnormalnih vrednosti unutar grupe i broja standardnih devijacija različitih od srednje dobijene vrednosti postoji i specifična je za svaki analit, što se slaže sa našim rezultatima. Isti autori zaključuju da ako je vrednost zbirnog uzorka bila manja od 0,25 standardnih devijacija (opseg 0,1-0,5) od srednje vrednosti zdrave populacije, onda je < 10% pojedinačnih krava koje učestvuju u pulu imalo abnormalne vrednosti metaboličkih parametara krvi.

Kada se svi ovi podaci znaju potrebno je da se formiraju referentne vrednosti zbirnih uzoraka krvi za različite analite, kako bi se na osnovu te vrednosti iz zbirnog uzorka moglo utvrditi koji procenat krava ima vrednosti metabolita izvan

rutinski korišćenih uobičajenih referentnih vrednosti za pojedinačne uzorke krvi krava. U našem radu smo utvrdili referente opsege Z skora koji uvrđuju da se određeni procenat ketoznih krava nalazi u zbirnom uzorku krvi. Ovakva klasifikacija je moguća i slaže se se ranijim rezultatima istraživača (13).

Vrednost Z-skora pulovanog uzorka i izračunate srednje vrednosti pojedinačnih uzoraka koji učestvuju u pulu međusobno visoko koreliraju (koeficijentom teteterminacije preko 99%). Na osnovu navednog zaključujemo da se Z-skor pulovanog uzorka može koristiti u proceni metaboličkog statusa pojedinačnih krava čiji uzorci ulaze u zbirni uzorak u kom je merena koncentracija parametara. Upotrebom ANOVA analize smo ispitali razliku pozicione vrednosti (Z-skor) i originalne vrednosti metabolita u zbirnom uzorku krvi kao i dobijenoj aritmetičkoj sredini pojedinačnih uzoraka koji su ušli u pripadajući zbirni uzorak, a koji potiču od krava u ranoj laktaciji, srednjoj laktaciji i od krava koje pokazuju metaboličke disbalanse u vidu hiperketonemije. ANOVA analiza je pokazala da većina ispitivanih parametara ispoljava statistički značajnu razliku (nivo značajnosti $p < 0,01$ ili veći) u funkciji perioda laktacije i zdravstvenog statusa. Gotovo identično su se ponašali zbirni uzorak krvi, poziciona vrednost zbirnog uzorka krvi, aritmetička sredina pojedinačnih uzoraka koji ulaze u pripadajući zbirni uzorak i poziciona vrednost aritmetičke sredine uzoraka. Nađeno je značajno odstupanje vrednosti parametara u ketotičnoj grupi krava, dok odstupanje vrednosti metaboličkih parametara kod krava u ranoj i srednjoj laktaciji nije pokazalo statistički značajno odstupanje za najveći broj parametara. Upotreba Z skora zbirnog uzorka krvi može biti korisna u proceni metaboličkog statusa krava, posebno kada postoje krave sa metaboličkim disbalansima. Potrebno je uzimati uže vremenske okvire u kojima se nalaze pojedinačni uzorci krava kada se vrši procena uticaja perioda laktacije na metaboličke parametre kako bi zbirni uzorak krvi pokazao da li postoje značajne razlike, zbog statističke osobine zbirnog uzorka da uprosečuje i stabilizuje vrednosti parametara koje u njemu merimo.

Naši rezultati zajedno sa rezultatima predhodnih istraživača (11-15) potvrđuju da se može uspešno koristiti zbirni uzorak krvi u proceni metaboličkog statusa krava u različitim periodima laktacija, ali da je potrebno usvojiti određena pravila pulovanja i grupisanja jedinki.

Grafikon 1. Srednja vrednost pulovanih zbirnih uzoraka u ranoj (1) i srednjoj (2) laktaciji i kod krava u ketozi (3).

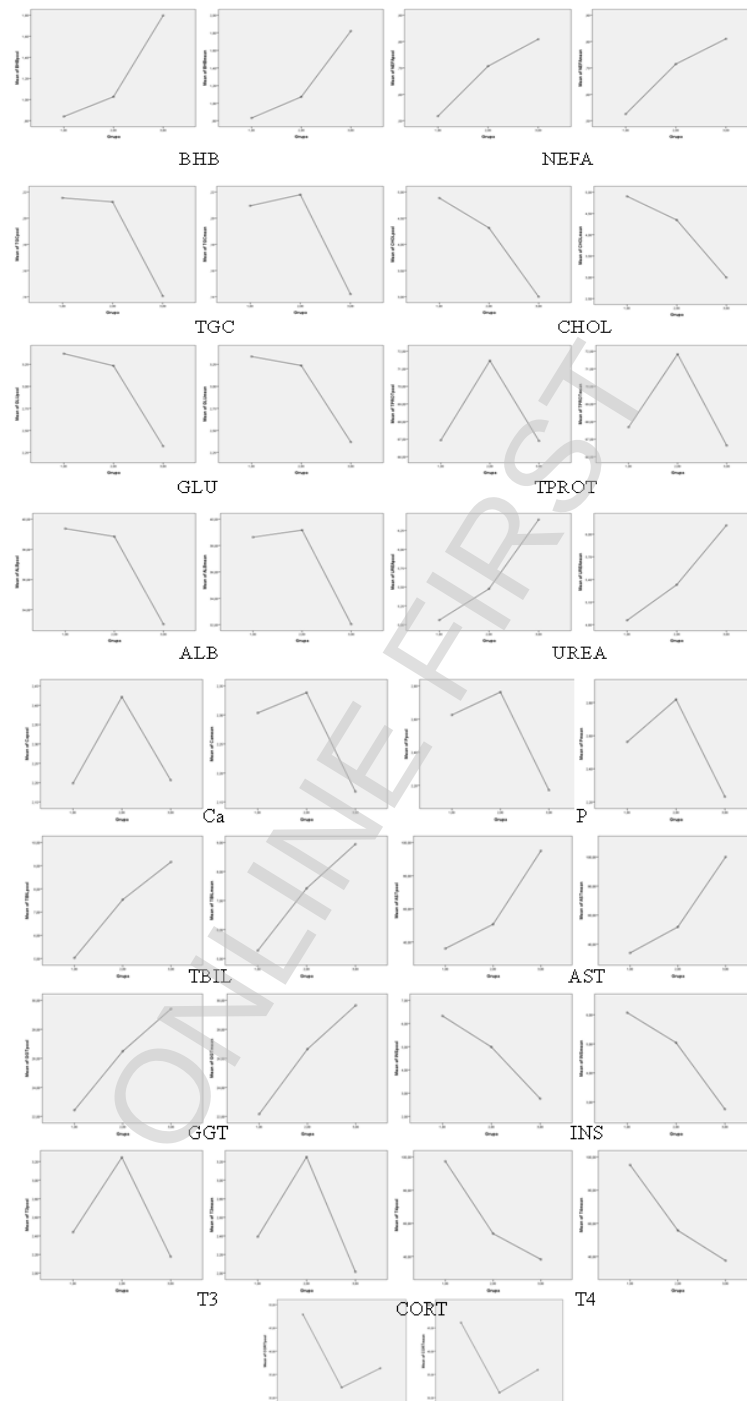


Tabela 1. ANOVA analiza uticaj perioda laktacije i zdravstvenog statusa krava na vrednost parametara u zbirnom uzorku krvi i izračunatoj srednjoj vrednosti pojedinačnih uzorakaka koji su ušli u navedeni pul

	Sum of Squares	Mean Square	F	p
BHBpool	10,280	5,140	124,102	0,000
BHBmean	10,633	5,317	138,056	0,000
ZBHBpool	122,247	61,124	123,923	0,000
ZBHBmean	126,868	63,434	136,944	0,000
NEFApool	,875	,438	11,885	0,000
NEFAmean	,842	,421	10,753	0,000
ZNEFApool	16,552	8,276	11,913	0,000
ZNEFAmean	15,958	7,979	10,758	0,000
TGCpool	,072	,036	5,479	0,007
TGCmean	,069	,035	5,152	0,009
ZTGCpool	7,212	3,606	5,479	0,007
ZTGCmean	6,928	3,464	5,164	0,009
CHOLpool	37,399	18,699	9,261	0,000
CHOLmean	38,457	19,228	9,437	0,000
ZCHOLpool	13,397	6,698	9,256	0,000
ZCHOLmean	13,839	6,920	9,459	0,000
GLUpool	13,066	6,533	19,543	0,000
GLUmean	11,414	5,707	17,211	0,000
ZGLUpool	22,602	11,301	19,471	0,000
ZGLUmean	19,776	9,888	17,143	0,000
TPROTpool	275,350	137,675	1,555	0,220
TPROTmean	301,725	150,863	1,543	0,223
ZTPROTpool	5,885	2,943	1,555	0,220
ZTPROTmean	6,449	3,225	1,543	0,223
ALBpool	495,236	247,618	8,086	0,001
ALBmean	630,496	315,248	10,452	0,000
ZALBpool	18,866	9,433	8,078	0,001
ZALBmean	24,085	12,043	10,463	0,000
UREApool	18,589	9,294	3,977	0,024
UREAmean	16,182	8,091	3,768	0,029
ZUREApool	9,724	4,862	3,963	0,024
ZUREAmean	8,492	4,246	3,770	0,029
Capool	,640	,320	6,812	0,002
Camean	,324	,162	3,236	0,047
ZCapool	6,676	3,338	6,845	0,002
ZCamean	3,412	1,706	3,285	0,045
Ppool	3,831	1,915	13,161	0,000
Pmean	3,458	1,729	11,555	0,000
ZPpool	23,967	11,983	13,130	0,000
ZPmean	21,636	10,818	11,573	0,000
TBILpool	173,593	86,797	10,168	0,000
TBILmean	135,828	67,914	8,354	0,001
ZTBILpool	3,840	1,920	10,123	0,000
ZTBILmean	3,032	1,516	8,382	0,001
ASTpool	37,660,786	18,830,393	30,211	0,000
ASTmean	46,851,808	23,425,904	34,795	0,000
ZASTpool	16,208	8,104	30,160	0,000
ZASTmean	20,118	10,059	34,733	0,000
GGTpool	491,425	245,712	7,316	0,001
GGTmean	569,067	284,534	8,082	0,001
ZGGTpool	6,614	3,307	7,303	0,002
ZGGTmean	7,685	3,843	8,060	0,001
INSpool	129,557	64,778	20,917	0,000
INSmean	115,765	57,883	19,080	0,000
ZINSpool	17,801	8,901	21,005	0,000
ZINSmean	15,861	7,930	19,004	0,000
T3pool	12,403	6,202	5,468	0,007
T3mean	16,063	8,032	7,256	0,002

ZT3pool	5,883	2,942	5,449	0,007
ZT3mean	7,620	3,810	7,264	0,002
T4pool	37,613,641	18,806,821	21,566	0,000
T4mean	34,788,742	17,394,371	20,534	0,000
ZT4pool	12,018	6,009	21,570	0,000
ZT4mean	11,067	5,534	20,429	0,000
CORTpool	2,650,159	1,325,080	6,341	0,003
CORTmean	2,359,365	1,179,682	6,420	0,003
ZCORTpool	6,560	3,280	6,341	0,003
ZCORTmean	5,840	2,920	6,420	0,003

ACKNOWLEDGEMENT

This paper was created as a result of research within the "Agreement on the transfer of funds for the financing of scientific research work of teaching staff at accredited Higher Education Institutions in 2024, contract registration number: 451-03-65/2024-03/ 200117".

LITERATURA

1. Heffernan A.L., Aylward L.L., Toms L.M.L., Sly P.D., Macleod M., Mueller J.F. Pooled biological specimens for human biomonitoring of environmental chemicals: opportunities and limitations. *Journal of exposure science & environmental epidemiology* 2014, 24(3), 225-232.
2. Caudill S.P. Characterizing populations of individuals using pooled samples. *J Exposure Sci Environ Epidemiol* 2010, 20: 29–37.
3. Schisterman E.F., Vexler A. To pool or not to pool, from whether to when: applications of pooling to biospecimens subject to a limit of detection. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2008; 22: 486–496.
4. Schisterman E.F., Vexler A., Mumford S.L., Perkins N.J. Hybrid pooled-unpooled design for cost-efficient measurement of biomarkers. *Stat Med* 2010; 29: 597–613.
5. Caudill S.P. Use of pooled samples from the National Health and Nutrition Examination Survey. *Stat Med* 2012, 31: 3269–3277.
6. Guang Y., Yuzhong L., Hui L. Statistical and Experimental Evidence in a Design of Pooled Serum Sample Measurements to Improve Research Efficiency. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2020, 21-25.
7. Van Saun R.J., Wustenberg M. Metabolic profiling to evaluate nutritional and disease status. *Bov Pract* 1997, 31(2): 37-42.
8. Van Saun R.J. Nutritional profiles: A new approach for dairy herds. *Bov Pract* 1997, 31(2): 43-50.
9. Van Saun R.J. Using a pooled sample technique for herd metabolic profile screening, in *Proc 12th International Conf Production Diseases of Farm Animals*, East Lansing, Michigan, July 18-23, pg 91 (Abstract P-9), 2004.
10. Van Saun R.J. Use and interpretation of pooled metabolic profiles for evaluating transition cow health status. *Proc Am Assoc Bov Pract*, 38:180, 2005.
11. Van Saun R.J. Validation of a pooled sample technique for herd metabolic profile screening. *Proceedings XXIV World Buiatrics Congress*, Nice, France, October 15-19, 2006a (Abstract #50/OS07-3 (CD-ROM Proceedings)).
12. Van Saun R.J. Interpretation of pooled metabolic profiles for evaluating transition cow health status. *Proceedings XXIV World Buiatrics Congress*, Nice, France, October 15-19, 2006b (Abstract #117/PS3-015 (CD-ROM Proceedings)).
13. Cincović M., Belić B., Toholj B., Stevančević M., Djokovic R.: *Poboljšanje postupka procene metaboličkog statusa krava u ranoj laktaciji upotrebom zbirnog uzorka krvnog seruma–poboljšani tehnološki postupak* M-84, 2015.
14. Lehwenich T. Investigation to the use of metabolic profile test in herd management of dairy cattle. *Dissertation*, Berlin University, Germany, 1999
15. Tornquist S.J., Van Saun R.J. Comparison of biochemical parameters in individual and pooled bovine sera. *Vet Path* 36(5):487, Abstr, 1990.