



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
POLJOPRIVREDNI FAKULTET  
DEPARTMAN ZA VETERINARSKU MEDICINU

**KLINIČKI I ULTRAZVUČNI  
PREGLED VIMENA KRAVA NAKON  
PRIMENE LAKTOFERINA U  
PERIODU INVOLUCIJE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentori:  
Dr Miodrag Radinović, docent  
Dr Kosta Petrović, vanredni profesor

Kandidat:  
Annamaria Galfi, dr vet.

Novi Sad, 2016. godine

**UNIVERZITET U NOVOM SADU  
POLJOPRIVREDNI FAKULTET**

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada: VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Annamaria Galfi, dr vet.
Mentori: MN	Dr Miodrag Radinović, docent Dr Kosta Petrović, vanredni profesor
Naslov rada: NR	Klinički i ultrazvučni pregled vimena krava nakon primene laktoferina u periodu involucije
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	Srpski / engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Autonomna Pokrajina Vojvodina
Godina: GO	2016.
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8.
Fizički opis rada: FO	8 poglavlja / 174 stranice / 42 slika / 50 tabela / 14 grafikona / 261 referenci / 5 priloga
Naučna oblast: NO	Veterinarska medicina
Naučna disciplina: ND	Bolesti životinja i higijena animalnih proizvoda, Radiologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	vime, krava, mleko, laktoferin, imunoglobulin G, ultrasonografija, patogeni vimena
UDK	613.287.5:591.469:591.111.8(043.3)

<p>Čuva se: ČU</p>	<p>U biblioteci Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu 21000 Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8.</p>
<p>Važna napomena: VN</p>	<p>Nema</p>
<p>Izvod: IZ</p> <p>Kontrola zdravlja vimena krava je bitan element u procesu proizvodnje zdravstveno bezbednog mleka, te se na farmama visokomlečnih krava, kroz program kontrole mastitisa, redovno sprovode mere otkrivanja i prevencije bolesti vimena. Klinički pregled vimena predstavlja osnovni metod koji pruža korisne informacije o zdravstvenom statusu vimena krava, ali nailazi na poteškoće u otkrivanju patoloških promena unutar parenhima i papile vimena. U cilju otkrivanja promena u parenhimu vimena može se primeniti ultrazvučni pregled koji omogućava vizualizaciju strukturnih promena vimena nastalih kao posledica upalnih procesa i tako olakšava dijagnostiku oboljenja.</p> <p>Tokom poslednjih godina, javio se problem povećanja rezistencije bakterija na antimikrobne lekove, što otežava lečenje bolesti, ali i ugrožava zdravlje životinja i ljudi. Najčešći uzroci toga su nepravilna upotreba i eventualna zloupotreba antimikrobnih lekova. Mnoga istraživanja vršena su u <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> uslovima na primeni laktoferina samog ili u kombinaciji sa antibioticima u terapiji i prevenciji mastitisa krava. Laktoferin, gvožđe vezujući antimikrobni glikoprotein koji se nalazi u mleku i drugim sekretima, predstavlja bitan deo sistema odbrane mlečne žlezde.</p> <p>Cilj istraživanja u okviru ove disertacije je procena dijagnostičke mogućnosti ultrazvučnog pregleda u detekciji subkliničkog mastitisa i poremećene sekrecije vimena, kao i razmatranje opravdanosti primene laktoferina u prevenciji i lečenju mastitisa.</p> <p>Kliničkim pregledom izvršena je procena opšteg zdravstvenog stanja krava, kao i ispitivanje mlečne žlezde adspekcijom i palpacijom. Za otkrivanje poremećene sekrecije vimena i subkliničkih mastitisa korišćeni su brzi testovi, Kalifornija mastitis test i Draminski test, kao i ultrazvučni pregled mlečne žlezde krava. Određivanje broja somatskih ćelija u uzorcima mleka urađeno je metodom protočne citometrije. Za identifikaciju uzročnika mastitisa korišćene su klasične mikrobiološke metode. Krave sa pozitivnim bakteriološkim nalazom podeljene su u dve ogledne grupe. Krave ogledne grupe I su tretirane intramamarnom aplikacijom antibiotika, dok je kravama ogledne grupe II aplikovana kombinacija antibiotika i laktoferina. Određivanje koncentracije imunoglobulina G u mlečnom serumu krava vršeno je metodom radioimunodifuzije, a određivanje koncentracije laktoferina u mleku krava ELISA testom.</p> <p>U istraživanjima u okviru ove disertacije, najčešće izolovani <i>major</i> mastitis patogeni bile su bakterije <i>Staphylococcus aureus</i> i <i>Streptococcus agalactiae</i>, a najčešće izolovani <i>minor</i> mastitis patogeni <i>Corynebacterium</i> spp. i koagulaza negativne stafilokoke. Ultrasonografija mlečne žlezde krava pokazala se kao efikasna metoda u dijagnostici poremećaja sekrecije vimena. Veće vrednosti koncentracije imunoglobulina G u mlečnom serumu krava uočene su tokom perioda predzasišenja i zasušenja, u odnosu na period rane laktacije. Najveći uticaj na porast koncentracije laktoferina u mleku krava su imali bakterijski uzročnici mastitisa. Efikasnost antibiotske terapije primenjene tokom perioda zasušenja kod krava ogledne grupe I iznosila je 52,7%, dok je efikasnost primenjene terapije sa goveđim laktoferinom i antibiotikom kod krava ogledne grupe II iznosila 60%. Aplikacija laktoferina tokom perioda zasušenja doprinela je efikasnosti terapije intramamarnih infekcija, ali nije imala uticaj na koncentraciju laktoferina u mleku tokom perioda rane laktacije.</p> <p>Dalja istraživanja su neophodna kako bi se u potpunosti potvrdila efikasnost intramamarne terapije sa goveđim laktoferinom i antibiotikom u cilju eliminacije uzročnika mastitisa i da se precizno odredi terapijska koncentracija laktoferina.</p>	

Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	03. jun 2015.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	<p>Predsednik: _____ <b>Dr Stanko Boboš, redovni profesor,</b> Poljoprivredni fakultet, Novi Sad;</p> <p>Mentor: _____ <b>Dr Miodrag Radinović, docent,</b> Poljoprivredni fakultet, Novi Sad;</p> <p>Mentor: _____ <b>Dr Kosta petrović, vanredni profesor,</b> Medicinski fakultet Novi Sad;</p> <p>Član: _____ <b>Dr Sara Savić, viši naučni saradnik,</b> Institut za veterinarstvo „Novi Sad“, Novi Sad;</p> <p>Član: _____ <b>Dr Marija Pajić, docent,</b> Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.</p>

**UNIVERSITY OF NOVI SAD  
FACULTY OF AGRICULTURE**

**KEY WORD DOCUMENTATION**

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	Ph.D. Thesis
Author: AU	Annamaria Galfi, DVM
Mentor: MN	Miodrag Radinović, Ph.D. Assistant Professor Kosta Petrović, Ph.D. Associate Professor
Title: TI	Clinical and ultrasound examination of cow udders after lactoferrin application in the involution period
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	Serbian / English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Autonomous Province of Vojvodina
Publication year: PY	2016
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	Republic of Serbia, Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8.
Physical description: PD	8 chapters /174 pages / 50 tables / 42 figures / 14 charts / 261 literature quotation / 5 annexes
Scientific field SF	Veterinary medicine
Scientific discipline SD	Animal diseases and hygiene of animal production, Radiology
Subject, Key words SKW	udder, cow, milk, lactoferrin, immunoglobulin G, ultrasonography, udder pathogens
UDC	613.287.5:591.469:591.111.8(043.3)

Holding data: HD	Library of The Faculty of Agriculture, University of Novi Sad 21000 Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8, Republic of Serbia
Note: N	None
<p data-bbox="231 349 352 383"><b>Abstract:</b></p> <p data-bbox="231 387 280 421"><b>AB</b></p> <p data-bbox="231 423 1362 696">Control of udder health is an essential element in the process of safe milk production, thus, through the mastitis control program, dairy farms regularly conduct measures of detection and prevention of udder diseases. Clinical examination of the udder is a basic method that provides useful information about the health status of cow udders, but this method is limited in its ability to detect pathological changes in the udder parenchyma and teat. In order to detect changes in the parenchyma of the udder, an ultrasound can be applied which allows visualization of udder structural changes incurred as a result of inflammatory processes, thus facilitating diagnosis of diseases.</p> <p data-bbox="231 701 1362 943">Over the last few years, the problem of increasing resistance to antimicrobial drugs has appeared, making it difficult to treat disease and also threaten the health of animals and humans. The incorrect and widespread use of antimicrobial drugs are the most common cause of this. Many studies were conducted <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> conditions on the use of lactoferrin alone or in combination with antibiotics in the treatment and prevention of mastitis. Lactoferrin, an iron-binding antimicrobial glycoprotein which is found in milk and other secretions, represents an important part of the mammary gland defense system.</p> <p data-bbox="231 947 1362 1084">The aim of the research within this thesis was to evaluate the diagnostic possibilities of udder ultrasonography in the detection of subclinical mastitis and udder secretion disorders, as well as considering the feasibility of lactoferrin application in the prevention and treatment of mastitis.</p> <p data-bbox="231 1088 1362 1503">The general condition of the animals was evaluated by clinical examination, as well as udder examination by adsppection and palpation. The California mastitis test, Draminski test and ultrasound examination of the cow's mammary glands were used for detection of udder secretion disorders and subclinical mastitis. Somatic cell count in milk samples was determined by flow cytometry method. Classical microbiological methods were used for the isolation and identification of mastitis causative agents. Cows with positive bacteriological findings were divided into two experimental groups. Cows in experimental group I were treated with intramammary applications of antibiotics, while the cows in experimental group II were treated with a combination of antibiotics and lactoferrin. Immunoglobulin G concentration in bovine milk serum was determined by the immunodiffusion method, while lactoferrin concentration in bovine milk was determined using the ELISA test.</p> <p data-bbox="231 1507 1362 1962">In this study, the most common isolated major mastitis pathogens were <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Streptococcus agalactiae</i>, while <i>Corynebacterium</i> spp. and coagulase-negative staphylococci were the most commonly detected minor mastitis pathogens. Ultrasonography of the bovine mammary gland proved to be an effective method in the diagnosis of udder secretion disorders. Higher immunoglobulin G concentrations were observed in milk serum from cows during pre-dry and dry period, relative to early lactation period. The biggest influence on the increase in the concentration of lactoferrin in the bovine milk had mastitis pathogens. The efficacy of antibiotic therapy during the dry period in cows of experimental group I was 52.7%, while the efficacy of the applied therapy with lactoferrin and antibiotics in cows of experimental group II was 60%. Application of lactoferrin during the dry period contributed to the effectiveness of the treatment of intramammary infections, but had no influence on lactoferrin concentration in the milk during the early lactation period.</p> <p data-bbox="231 1966 1362 2065">Further studies are necessary in order to fully confirm the efficacy of intramammary therapy with bovine lactoferrin and antibiotic to eliminate the mastitis pathogens and to determine the therapeutic concentration of lactoferrin.</p>	

Accepted on Scientific Board on: AS	03 June 2015
Defended: DE	
Thesis Defence Board: DB	<p>President: _____  <b>Stanko Boboš, Ph.D. Full Professor,</b>  Faculty of Agriculture, Novi Sad;</p> <p>Mentor: _____  <b>Miodrag Radinović, Ph.D. Assistant Professor,</b>  Faculty of Agriculture, Novi Sad;</p> <p>Mentor: _____  <b>Kosta Petrović, Ph.D. Associate Professor,</b>  Faculty of Medicine, Novi Sad;</p> <p>Member: _____  <b>Sara Savić, Ph.D. Senior Research Associate,</b>  Scientific Veterinary Institute “Novi Sad”, Novi Sad;</p> <p>Member: _____  <b>Marija Pajić, Ph.D. Assistant Professor,</b>  Faculty of Agriculture, Novi Sad.</p>

## SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
2.	PREGLED LITERATURE.....	4
2.1.	Anatomska i histološka građa mlečne žlezde - <i>glandula lactifera</i> .....	4
2.2.	Klinički pregled vimena krava.....	9
2.2.1.	Pregled suspenzornog sistema vimena.....	9
2.2.2.	Pregled kože vimena krava.....	10
2.2.3.	Pregled sisa vimena krava.....	12
2.3.	Ultrazvučna vizualizacija mlečne žlezde, kao i njen značaj u otkrivanju poremećene sekrecije vimena.....	15
2.3.1.	Ultrazvučna vizualizacija parenhima i papile zdrave mlečne žlezde krava.....	16
2.3.2.	Ultrazvučna vizualizacija parenhima i papile mlečne žlezde sa patomorfološkim promenama.....	18
2.4.	Rast i razvoj mlečne žlezde.....	23
2.4.1.	Prenatalni - fetalni razvoj mlečne žlezde.....	23
2.4.2.	Postnatalni razvoj mlečne žlezde.....	23
2.5.	Imunobiologija mlečne žlezde.....	27
2.6.	Laktoferin.....	31
2.6.1.	Istorijski podaci o laktoferinu.....	32
2.6.2.	Struktura laktoferina.....	32
2.6.3.	Antimikrobni peptidi laktoferina.....	35
2.6.4.	Sinteza i eliminacija laktoferina iz organizma.....	38
2.6.5.	Biološka funkcija laktoferina.....	38
2.6.5.1.	Antibakterijska aktivnost laktoferina.....	39
2.6.5.2.	Antivirusna aktivnost laktoferina.....	42
2.6.5.3.	Antifungalna aktivnost laktoferina.....	43
2.6.5.4.	Antiparazitska aktivnost laktoferina.....	44
2.6.5.5.	Antiinflamatorna aktivnost laktoferina.....	45
2.6.5.6.	Antikancerogena aktivnost laktoferina.....	46
2.6.6.	Koncentracija laktoferina u mleku i drugim sekretima.....	46
2.6.7.	Faktori koji utiču na koncentraciju laktoferina u sekretu zdrave mlečne žlezde.....	49
2.6.7.1.	Stadijum laktacije, starost i rasa životinje kao faktori koji utiču na koncentraciju laktoferina u mleku krava.....	49
2.6.7.2.	Odnos broja somatskih ćelija i koncentracije laktoferina u mleku krava.....	51
2.6.7.3.	Odnos koncentracije citrata i laktoferina u mleku krava.....	51
2.6.7.4.	Način držanja krava i koncentracija laktoferina u mleku.....	52
2.6.8.	Koncentracija laktoferina u mlečnom sekretu tokom intramamarnе infekcije.....	52
2.6.9.	Kombinovana primena laktoferina i antibiotika u terapiji mastitisa.....	54
3.	CILJEVI I ZADACI DISERTACIJE.....	57



4.	MATERIJAL I METODE.....	59
4.1.	Formiranje ogledne grupe krava.....	59
4.2.	Klinički pregled krava.....	60
4.3.	Brzi testovi za otkrivanje poremećene sekrecije vimena i subkliničkih mastitisa.....	60
4.3.1.	Kalifornija mastitis test ( <i>California mastitis test</i> - CMT).....	60
4.3.1.1.	Postupak rada i interpretacija rezultata.....	61
4.3.2.	Električna provodljivost mleka određena Draminski mastitis detektorom.....	61
4.3.2.1.	Postupak rada i interpretacija rezultata.....	62
4.3.3.	Ispitivanje senzitivnosti i specifičnosti Kalifornija mastitis testa i Draminski mastitis detektora.....	62
4.4.	Ultrazvučni pregled mlečne žlezde krava.....	63
4.4.1.	Postupak rada.....	63
4.5.	Uzimanje uzoraka mleka od krava u ogledu.....	65
4.6.	Određivanje broja somatskih ćelija u uzorcima mleka.....	66
4.7.	Bakteriološki pregled uzoraka mleka na uzročnika mastitisa.....	66
4.7.1.	Izolacija i identifikacija bakterije <i>Staphylococcus aureus</i> .....	67
4.7.1.1.	Testovi katalaze i oksidaze.....	67
4.7.1.2.	Mikroskopski izgled.....	67
4.7.1.3.	Test koagulacije plazme kunića.....	67
4.7.1.4.	Fenotipske karakteristike.....	68
4.7.2.	Izolacija i identifikacija bakterije <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	69
4.7.2.1.	Testovi katalaze i oksidaze.....	70
4.7.2.2.	Mikroskopski izgled.....	70
4.7.2.3.	CAMP test.....	70
4.7.2.4.	Fenotipske karakteristike.....	70
4.7.3.	Izolacija i identifikacija bakterije <i>Enterococcus faecalis</i> .....	71
4.7.3.1.	Testovi katalaze i oksidaze.....	71
4.7.3.2.	Mikroskopski izgled.....	72
4.7.3.3.	CAMP test.....	72
4.7.3.4.	Fenotipske karakteristike.....	72
4.7.4.	Izolacija i identifikacija bakterije <i>Arcanobacterium pyogenes</i> .....	72
4.7.4.1.	Testovi katalaze i oksidaze.....	73
4.7.4.2.	Mikroskopski izgled.....	73
4.7.4.3.	CAMP test.....	73
4.7.5.	Izolacija i identifikacija bakterija iz roda <i>Corynebacterium</i> .....	73
4.7.5.1.	Testovi katalaze i oksidaze.....	74
4.7.5.2.	Mikroskopski izgled.....	74
4.7.5.3.	CAMP test.....	74
4.7.5.4.	Fenotipske karakteristike.....	75
4.8.	Intramamarna aplikacija antibiotika i laktoferina.....	75
4.8.1.	Priprema rastvora laktoferina.....	76
4.9.	Određivanje koncentracije imunoglobulina G u mlečnom serumu krava.....	76
4.10.	Određivanje koncentracije laktoferina u mlečnom serumu krava.....	78
4.10.1.	Oprema i reagensi.....	78
4.10.2.	Pufer za blokiranje reakcije, rastvarač za uzorak/konjugat i rastvor za ispiranje ELISA reakcije.....	79

4.10.2.1.	Priprema pufera.....	80
4.10.3.	Oblaganje ( <i>coating</i> ) i blokiranje ( <i>blocking</i> ) mikrotitar ploča.....	80
4.10.3.1.	Postupak rada.....	80
4.10.4.	Priprema uzoraka i standarda za ELISA test.....	81
4.10.5.	Dodavanje konjugata, supstrata, stop rastvora i merenje apsorbance.....	81
4.11.	Statistična analiza podataka.....	83
5.	REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....	84
5.1.	Identifikacija krava ogledne grupe I sa kliničkim i subkliničkim oblikom mastitisa.....	84
5.1.1.	Klinički pregled vimena krava ogledne grupe I u periodu zasušenja.....	84
5.1.2.	5.1.2. Bakteriološki nalaz mleka krava ogledne grupe I u periodu zasušenja.....	85
5.1.3.	Klinički pregled vimena krava ogledne grupe I u periodu rane laktacije .....	86
5.1.4.	Bakteriološki nalaz mleka krava ogledne grupe I u periodu rane laktacije.....	87
5.2.	Identifikacija krava ogledne grupe II sa kliničkim i subkliničkim oblikom mastitisa.....	88
5.2.1.	Klinički pregled vimena krava ogledne grupe II u periodu predzasušenja.....	88
5.2.2.	Bakteriološki nalaz mleka krava ogledne grupe II u periodu pred zasušenje.....	89
5.2.3.	Klinički pregled vimena krava ogledne grupe II u periodu rane laktacije.....	90
5.2.4.	Bakteriološki nalaz mleka krava ogledne grupe II u periodu rane laktacije.....	90
5.3.	Efikasnost primenjene terapije tokom perioda zasušenja kod krava ogledne grupe I i II.....	91
5.4.	Brzi testovi za identifikaciju krava sa poremećenom sekrecijom vimena..	92
5.4.1.	Električna otpornost mleka krava ogledne grupe I u periodu zasušenja.....	92
5.4.2.	Električna otpornost mleka krava ogledne grupe I u periodu rane laktacije.....	94
5.4.3.	Ispitivanje senzitivnosti i specifičnosti Draminski mastitis testa.....	96
5.4.4.	Rezultati Kalifornija mastitis testa kod krava ogledne grupe II tokom perioda predzasušenja.....	97
5.4.5.	Rezultati Kalifornija mastitis testa kod krava ogledne grupe II tokom perioda rane laktacije.....	97
5.4.6.	Ispitivanje senzitivnosti i specifičnosti Kalifornija mastitis testa.....	98
5.5.	Vrednosti broja somatskih ćelija u zbirnim uzorcima mleka krava.....	99
5.5.1.	Vrednosti broja somatskih ćelija u zbirnim uzorcima mleka krava ogledne grupe I u periodu zasušenja.....	99
5.5.2.	Vrednosti broja somatskih ćelija u zbirnim uzorcima mleka krava ogledne grupe I u periodu rane laktacije.....	99

5.5.3.	Vrednosti broja somatskih ćelija u zbirnim uzorcima mleka krava ogledne grupe II u periodu predzasušenja.....	99
5.5.4.	Vrednosti broja somatskih ćelija u zbirnim uzorcima mleka krava ogledne grupe II u periodu rane laktacije.....	100
5.6.	Ultrasonografija fiziološke i patološki promenjene mlečne žlezde krava.....	100
5.7.	Koncentracija imunoglobulina G u mlečnom serumu krava.....	107
5.7.1.	Koncentracija imunoglobulina G u mlečnom serumu krava ogledne grupe I u periodu zasušenja.....	107
5.7.2.	Koncentracija imunoglobulina G u mlečnom serumu krava ogledne grupe I u periodu rane laktacije.....	108
5.7.3.	Usporedni prikaz nalaza koncentracije imunoglobulina G u mlečnom serumu krava ogledne grupe I u periodu zasušenja i rane laktacije.....	110
5.7.4.	Koncentracija imunoglobulina G u mlečnom serumu krava ogledne grupe II u periodu predzasušenja.....	111
5.7.5.	Koncentracija imunoglobulina G u mlečnom serumu krava ogledne grupe II u periodu rane laktacije.....	113
5.7.6.	Usporedni prikaz nalaza koncentracije imunoglobulina G u mlečnom serumu krava ogledne grupe II u periodu predzasušenja i rane laktacije.....	114
5.7.7.	Usporedni prikaz nalaza koncentracije imunoglobulina G u mlečnom serumu krava ogledne grupe I i II u periodu predzasušenja i rane laktacije.....	115
5.8.	Koncentracija laktoferina u mleku krava.....	116
5.8.1.	Koncentracija laktoferina u mleku krava ogledne grupe I u periodu zasušenja.....	116
5.8.2.	Koncentracija laktoferina u mleku krava ogledne grupe I u periodu rane laktacije.....	118
5.8.3.	Usporedni prikaz nalaza koncentracije laktoferina u mleku krava ogledne grupe I u periodu zasušenja i rane laktacije.....	120
5.8.4.	Koncentracija laktoferina u mleku krava ogledne grupe II u periodu predzasušenja.....	121
5.8.5.	Koncentracija laktoferina u mleku krava ogledne grupe II u periodu rane laktacije.....	123
5.8.6.	Usporedni prikaz nalaza koncentracije laktoferina u mleku krava ogledne grupe II u periodu predzasušenja i rane laktacije.....	124
5.8.7.	Usporedni prikaz nalaza koncentracije laktoferina u mleku krava ogledne grupe I i II u periodu predzasušenja i rane laktacije.....	125
5.9.	Rezultati statističkog testa korelacije koncentracije imunoglobulina G i laktoferina u mleku krava.....	126
5.9.1.	Rezultati statističkog testa korelacije koncentracije imunoglobulina G i laktoferina u mleku krava ogledne grupe I u period zasušenja i rane laktacije.....	126
5.9.2.	Rezultati statističkog testa korelacije koncentracije imunoglobulina G i laktoferina u mleku krava ogledne grupe II u periodu predzasušenja i rane laktacije .....	127
6.	DISKUSIJA.....	129

6.1.	Klinički pregled vimena krava.....	129
6.2.	Bakteriološko ispitivanje mleka krava.....	131
6.3.	Efikasnost primenjene terapije tokom perioda zasušenja kod krava ogledne grupe I i II.....	132
6.4.	Identifikacija krava sa poremećenom sekrecijom vimena.....	135
	6.4.1. Električna otpornost mleka krava ogledne grupe I.....	135
	6.4.2. Kalifornija mastitis test.....	138
6.5.	Broj somatskih ćelija u zbirnim uzorcima mleka krava.....	139
6.6.	Ultrasonografija vimena krava.....	140
6.7.	Koncentracija imunoglobulina G u mlečnom serumu krava.....	142
6.8.	Koncentracija laktoferina u mleku krava.....	145
6.9.	Odnos koncentracije imunoglobulina G i laktoferina u mleku krava.....	148
7.	ZAKLJUČCI.....	149
8.	LITERATURA.....	151
	PRILOZI.....	168
	BIOGRAFSKI PODACI .....	174

## LISTA SLIKA

<b>Slika 1.</b>	Šematski prikaz epitelne ćelije mlečne alveole .....	6
<b>Slika 2.</b>	Povreda suspenzornih ligamenata vimena.....	10
<b>Slika 3.</b>	Edem vimena krava.....	11
<b>Slika 4.</b>	Akcesorne sise vimena krava.....	12
<b>Slika 5.</b>	Mehanička povreda papile vimena.....	13
<b>Slika 6.</b>	Hiperkeratoza papile vimena (5 stepen keratinizacije).....	14
<b>Slika 7.</b>	Opstrukcija papile vimena.....	14
<b>Slika 8.</b>	Ultrazvučni prikaz parenhima vimena krava.....	16
<b>Slika 9.</b>	Ultrazvučni prikaz sise mlečne žlezde krava.....	17
<b>Slika 10.</b>	Ultrazvučni prikaz limfnog čvora vimena krava.....	18
<b>Slika 11.</b>	Apsces žlezdanog parenhima vimena krava.....	19
<b>Slika 12.</b>	Hematom žlezdanog parenhima vimena krava.....	19
<b>Slika 13.</b>	Parenhim vimena krava inficiranih sa bakterijom <i>Arcanobacterium pyogenes</i> .....	20
<b>Slika 14.</b>	Prisustvo kalikulusa u sisnoj cisterni krave.....	21
<b>Slika 15.</b>	Opstrukcija sisne cisterne.....	22
<b>Slika 16.</b>	Anatomski, ultrazvučni i morfološki prikaz mlečne žlezde junica u različitim stadijumima njenog rasta i razvoja.....	26
<b>Slika 17.</b>	Fizička barijera sisnog kanala mlečne žlezde.....	28
<b>Slika 18.</b>	Struktura humanog hololaktoferina.....	34
<b>Slika 19.</b>	Tercijalna stuktura bLF sa prikazom laktofericina zelenom bojom, $\alpha$ -heliks strukture crvenom, $\beta$ -nabrane strukture plavom i jona gvožđa ljubičastom bojom.....	36
<b>Slika 20.</b>	N terminalni lobul laktoferina sa prikazom antimikrobnih peptida. Laktofericin prikazan zelenom bojom, laktoferampin sa ružičastom i LF1-11 plavom bojom.....	37
<b>Slika 21.</b>	Mehanizam antibakterijske aktivnosti laktoferina kod gram negativnih bakterija.....	40
<b>Slika 22.</b>	Mehanizam antibakterijske aktivnosti laktoferina kod gram pozitivnih bakterija.....	41
<b>Slika 23.</b>	Mehanizam antivirusne aktivnosti laktoferina.....	43
<b>Slika 24.</b>	Sadržaj proteina u kravljem mleku.....	47
<b>Slika 25.</b>	Sadržaj proteina u humanom mleku.....	47
<b>Slika 26.</b>	Ultrazvučni pregled parenhima mlečne žlezde.....	64
<b>Slika 27.</b>	Ultrazvučni pregled papile mlečne žlezde.....	64
<b>Slika 28.</b>	Goveđi laktoferin.....	76
<b>Slika 29.</b>	Određivanje koncentracije IgG pomoću RID ploča.....	77
<b>Slika 30.</b>	Izgled RID ploče nakon inkubacije i pojave precipitinskih prstenova.....	78
<b>Slika 31.</b>	Izgled mikrotitar ploče sa dodatim TMB supstratom.....	82
<b>Slika 32.</b>	Izgled mikrotitar ploče sa dodatim ELISA stop rastvorom.....	83
<b>Slika 33.</b>	Ultrazvučni prikaz fiziološkog parenhima vimena krava.....	101
<b>Slika 34.</b>	Ultrazvučni prikaz fiziološke papile vimena krava.....	101
<b>Slika 35.</b>	Ultrazvučni prikaz patološki promenjenog parenhima vimena krava.....	102
<b>Slika 36.</b>	Ultrazvučni prikaz patološki promenjenog parenhima vimena krava.....	102
<b>Slika 37.</b>	Ultrazvučni prikaz patološki promenjenog parenhima vimena krava.....	103
<b>Slika 38.</b>	Ultrazvučni prikaz patološki promenjenog parenhima vimena krava.....	103

<b>Slika 39.</b>	Ultrazvučni prikaz patološki promjenjenog parenhima vimena krava.....	104
<b>Slika 40.</b>	Ultrazvučni prikaz patološki promjenjene papile vimena krava.....	105
<b>Slika 41.</b>	Ultrazvučni prikaz fiziološkog limfnog čvora vimena krava.....	106
<b>Slika 42.</b>	Ultrazvučni prikaz uvećanog limfnog čvora kod krava sa znacima inflamacije vimena.....	106

## LISTA TABELA

<b>Tabela 1.</b>	Imunoglobulini u kolostrumu i mleku krava.....	30
<b>Tabela 2.</b>	Broj aminokiselinskih ostataka u goveđem i humanom laktoferinu....	33
<b>Tabela 3.</b>	Koncentracija laktoferina u telesnim sekretima čoveka.....	49
<b>Tabela 4.</b>	Interpretacija rezultata CMT testa.....	61
<b>Tabela 5.</b>	Interpretacija rezultata dobijeni Draminski mastitis detektorom.....	62
<b>Tabela 6.</b>	Fenotipske karakteristike za identifikaciju <i>Staphylococcus aureus</i> ....	69
<b>Tabela 7.</b>	Fenotipske karakteristike za identifikaciju <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	71
<b>Tabela 8.</b>	Fenotipske karakteristike za identifikaciju <i>Enterococcus faecalis</i> .....	72
<b>Tabela 9.</b>	Morfološke karakteristike kolonija <i>Corynebacterium</i> spp.....	74
<b>Tabela 10.</b>	Fenotipske karakteristike za identifikaciju bakterija roda <i>Corynebacterium</i> .....	75
<b>Tabela 11.</b>	Priprema standarda za ELISA test.....	81
<b>Tabela 12.</b>	Nalaz kliničkog pregleda vimena krava ogledne grupe I u periodu zasušenja.....	85
<b>Tabela 13.</b>	Nefunkcionalne papile vimena krava ogledne grupe I u periodu zasušenja.....	85
<b>Tabela 14.</b>	Bakteriološki nalaz uzoraka mleka krava ogledne grupe I u periodu zasušenja.....	86
<b>Tabela 15.</b>	Nalaz kliničkog pregleda vimena krava ogledne grupe I u periodu rane laktacije.....	87
<b>Tabela 16.</b>	Bakteriološki nalaz uzoraka mleka krava ogledne grupe I u periodu rane laktacije.....	87
<b>Tabela 17.</b>	Nalaz kliničkog pregleda vimena krava ogledne grupe II u periodu predzasušenja.....	88
<b>Tabela 18.</b>	Nefunkcionalne papile vimena krava ogledne grupe II u periodu predzasušenja.....	89
<b>Tabela 19.</b>	Bakteriološki nalaz uzoraka mleka krava ogledne grupe II u periodu predzasušenja.....	89
<b>Tabela 20.</b>	Nalaz kliničkog pregleda vimena krava ogledne grupe II u periodu rane laktacije.....	90
<b>Tabela 21.</b>	Bakteriološki nalaz uzoraka mleka krava ogledne grupe II u periodu rane laktacije.....	91
<b>Tabela 22.</b>	Efikasnost primenjene terapije tokom perioda zasušenja.....	92
<b>Tabela 23.</b>	Električna otpornost mleka krava ogledne grupe I u periodu zasušenja.....	92
<b>Tabela 24.</b>	Električna otpornost mleka krava ogledne grupe I u periodu zasušenja sa bakteriološkim nalazom.....	93
<b>Tabela 25.</b>	Minimalna, maksimalna i srednja vrednost električne otpornosti mleka krava ogledne grupe I u periodu zasušenja.....	94
<b>Tabela 26.</b>	Električna otpornost mleka krava ogledne grupe I u periodu rane laktacije.....	94
<b>Tabela 27.</b>	Električna otpornost mleka krava ogledne grupe I u periodu rane laktacije sa bakteriološkim nalazom.....	95
<b>Tabela 28.</b>	Minimalna, maksimalna i srednja vrednost električne otpornosti mleka krava ogledne grupe I u periodu rane laktacije.....	96

<b>Tabela 29.</b>	Senzitivnost i specifičnost Draminski mastitis detektora.....	96
<b>Tabela 30.</b>	Reakcija Kalifornija mastitis testa sa bakteriološkim nalazom uzoraka mleka krava ogledne grupe II u periodu predzasušenja.....	97
<b>Tabela 31.</b>	Reakcija Kalifornija mastitis testa sa bakteriološkim nalazom uzoraka mleka krava ogledne grupe II u periodu rane laktacije.....	98
<b>Tabela 32.</b>	Senzitivnost i specifičnost Kalifornija mastitis testa.....	98
<b>Tabela 33.</b>	Broj somatskih ćelija u zbirnim uzorcima mleka krava ogledne grupe I tokom perioda zasušenja.....	99
<b>Tabela 34.</b>	Broj somatskih ćelija u zbirnim uzorcima mleka ogledne grupe I tokom perioda rane laktacije.....	99
<b>Tabela 35.</b>	Broj somatskih ćelija u zbirnim uzorcima mleka krava ogledne grupe II tokom perioda predzasušenja.....	100
<b>Tabela 36.</b>	Broj somatskih ćelija u zbirnim uzorcima mleka ogledne grupe II tokom perioda rane laktacije.....	100
<b>Tabela 37.</b>	Koncentracija imunoglobulina G (g/L) u mlečnom serumu krava ogledne grupe I u periodu zasušenja sa bakteriološkim nalazom.....	108
<b>Tabela 38.</b>	Koncentracija imunoglobulina G (g/L) u mlečnom serumu krava ogledne grupe I u periodu rane laktacije sa bakteriološkim nalazom..	109
<b>Tabela 39.</b>	Koncentracija imunoglobulina G (g/L) u mlečnom serumu krava ogledne grupe I u periodu zasušenja i rane laktacije .....	111
<b>Tabela 40.</b>	Koncentracija imunoglobulina G (g/L) u mlečnom serumu krava ogledne grupe II u periodu predzasušenja sa bakteriološkim nalazom.....	112
<b>Tabela 41.</b>	Koncentracija imunoglobulina G (g/L) u mlečnom serumu krava ogledne grupe II u periodu rane laktacije sa bakteriološkim nalazom.....	114
<b>Tabela 42.</b>	Koncentracija imunoglobulina G (g/L) u mlečnom serumu krava ogledne grupe I u periodu predzasušenja i rane laktacije.....	115
<b>Tabela 43.</b>	Koncentracija laktoferina (mg/mL) u mleku krava ogledne grupe I u periodu zasušenja sa bakteriološkim nalazom.....	118
<b>Tabela 44.</b>	Koncentracija laktoferina (mg/mL) u mleku krava ogledne grupe I u periodu rane laktacije sa bakteriološkim nalazom.....	119
<b>Tabela 45.</b>	Koncentracija laktoferina (mg/mL) u mleku krava ogledne grupe I u periodu zasušenja i rane laktacije.....	121
<b>Tabela 46.</b>	Koncentracija laktoferina (mg/mL) u mleku krava ogledne grupe II u periodu predzasušenja sa bakteriološkim nalazom.....	122
<b>Tabela 47.</b>	Koncentracija laktoferina (mg/mL) u mleku krava ogledne grupe II u periodu rane laktacije sa bakteriološkim nalazom.....	124
<b>Tabela 48.</b>	Koncentracija laktoferina (mg/mL) u mleku krava ogledne grupe II u periodu predzasušenja i rane laktacije.....	125
<b>Tabela 49.</b>	Rezultati statističkog testa korelacije koncentracije imunoglobulina G i laktoferina u mleku krava ogledne grupe I u periodu zasušenja i rane laktacije.....	127
<b>Tabela 50.</b>	Rezultati statističkog testa korelacije koncentracije imunoglobulina G i laktoferina u mleku krava ogledne grupe II u periodu predzasušenja i rane laktacije.....	128



## LISTA GRAFIKONA

<b>Grafikon 1.</b>	Koncentracija imunoglobulina G (g/L) u mlečnom serumu krava ogledne grupe I u periodu zasušenja.....	107
<b>Grafikon 2.</b>	Koncentracija imunoglobulina G (g/L) u mlečnom serumu krava ogledne grupe I u periodu rane laktacije .....	109
<b>Grafikon 3.</b>	Koncentracija imunoglobulina G (g/L) u mlečnom serumu krava ogledne grupe I.....	110
<b>Grafikon 4.</b>	Koncentracija imunoglobulina G (g/L) u mlečnom serumu krava ogledne grupe II u periodu predzasušenja .....	112
<b>Grafikon 5.</b>	Koncentracija imunoglobulina G (g/L) u mlečnom serumu krava ogledne grupe II u periodu rane laktacije .....	113
<b>Grafikon 6.</b>	Koncentracija imunoglobulina G (g/L) u mlečnom serumu krava ogledne grupe II.....	114
<b>Grafikon 7.</b>	Koncentracija imunoglobulina G (g/L) u mlečnom serumu krava ogledne grupe I i II.....	116
<b>Grafikon 8.</b>	Koncentracija laktoferina (mg/mL) u mleku krava ogledne grupe I u periodu predzasušenja.....	117
<b>Grafikon 9.</b>	Koncentracija laktoferina (mg/mL) u mleku krava ogledne grupe I u periodu rane laktacije .....	119
<b>Grafikon 10.</b>	Koncentracija laktoferina (mg/mL) u mleku krava ogledne grupe I..	120
<b>Grafikon 11.</b>	Koncentracija laktoferina (mg/mL) u mleku krava ogledne grupe II u periodu predzasušenja.....	122
<b>Grafikon 12.</b>	Koncentracija laktoferina (mg/mL) u mleku krava ogledne grupe II u periodu rane laktacije .....	123
<b>Grafikon 13.</b>	Koncentracija laktoferina (mg/mL) u mleku krava ogledne grupe II..	124
<b>Grafikon 14.</b>	Koncentracija laktoferina (mg/mL) u mleku krava ogledne grupe I i II.....	126

## LISTA PRILOGA

<b>Prilog 1.</b>	Lista za unos podataka dobijenih kliničkim i ultrazvučnim pregledom vimena krava.....	169
<b>Prilog 2.</b>	Diferencijalne karakteristike stafilokoka.....	170
<b>Prilog 3.</b>	Diferencijalne karakteristike streptokoka.....	171
<b>Prilog 4.</b>	Osetljivost izolovanih mikroorganizama na antimikrobne lekove na osnovu disk- difuzione metode.....	172
<b>Prilog 5.</b>	Tablica određivanja imunoglobulina G na osnovu prečnika precitipinskog prstena.....	173

Ova disertacija urađena je u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije br. 31034 „Odabrane biološke opasnosti za bezbednost/kvalitet hrane animalnog porekla i kontrolne mere od farme do potrošača”.

## 1. UVOD

Tokom perioda laktacije i involucije mlečne žlezde krava, neophodno je sprovesti redovne preglede vimena radi utvrđivanja prisustva poremećaja zdravstvenog statusa. Osnovna metoda pregleda vimena krava je klinički pregled kojim se sa lakoćom mogu utvrditi spolja vidljive promene na mlečnoj žlezdi, ali nailazi na poteškoće u detekciji promena u parenhimu vimena. U cilju otkrivanja promena u parenhimu vimena može se primeniti ultrazvučni pregled koji omogućava vizualizaciju strukturnih promena vimena nastalih kao posledica upalnih procesa i tako olakšava dijagnostiku oboljenja.

Mastitis predstavlja jednu od najznačajnijih bolesti visokomlečnih krava koja nanosi velike ekonomske gubitke, pri čemu utiče na kvalitet i higijensku ispravnost mleka, kao i na dobrobit životinja. Najčešći uzrok nastanka zapaljenja mlečne žlezde je prodor patogenih mikroorganizama, pri čemu se bolest karakteriše patološkim promenama u tkivu mlečne žlezde koje dovode do fizičkih i hemijskih promena u sastavu mleka. Sharif i Muhammad (2008) navode da stepen oštećenja tkiva mlečne žlezde zavisi prvenstveno od patogenosti uzročnika, kao i od inflamatornog odgovora mlečne žlezde. Involucija mlečne žlezde predstavlja kritičan period za nastanak novih intramamarnih infekcija (Gaunt i sar., 1980).

Rana dijagnoza zapaljenja mlečne žlezde je od presudnog značaja za smanjenje ekonomskih gubitaka i uspešnu kontrolu mastitisa. Klinički pregled krava i vimena

omogućava laku dijagnozu kliničke forme mastitisa zahvaljujući izraženim znacima bolesti, kao što su crvenilo i otok vimena, bolnost pri palpaciji i prisustvo grudvica i gnoja u mleku, ali nailazi na poteškoće u otkrivanju subkliničke forme bolesti. Subklinički mastitis se definiše kao zapaljenje mlečne žlezde bez vidljivih znakova inflamacije dovodeći do povećanja broja somatskih ćelija mleka i do pada proizvodnje mleka za 15-45% (Swinkels i sar., 2005). Nielen i sar. (1995) navode da se subklinička forma mastitisa može otkriti izolacijom uzročnika mastitisa i otkrivanjem inflamatornih komponenti u mleku.

Stoga su za otkrivanje subkliničke forme mastitisa razvijene dijagnostičke metode koje su zasnovane na određivanju broja somatskih ćelija u mleku. Pored direktnih metoda, postoje i indirektne metode, kao što su Kalifornija mastitis test i Draminski mastitis detektor, na osnovu čijih rezultata se procenjuje broj somatskih ćelija u mleku. Tokom poslednjih godina, ultrazvuk je našao široku primenu u dijagnostici subkliničkog mastitisa i poremećene sekrecije vimena. Istraživanja su pokazala da ultrasonografija pruža značajne informacije o zdravstvenom statusu vimena, i omogućava procenu uspešnosti primenjene terapije, ali ne može zameniti dijagnostičke metode, kao što su mikrobiološka analiza i određivanje broja somatskih ćelija (Flöck i Winter, 2006; Hussein i sar., 2015).

Odbrana mlečne žlezde od patogenih uzročnika mastitisa, zasniva se na postojanju zaštitnih mehanizama odbrane u koje spadaju, u prvom redu, anatomska odbrana, celularna odbrana i određeni rastvorljivi faktori. Tokom ranog perioda zapaljenja mlečne žlezde, primarnu ulogu imaju leukociti, odnosno somatske ćelije mleka, kao predstavnici celularne odbrane. U akutnoj fazi infekcije vimena, neutrofilni granulociti su dominantne ćelije u tkivu i sekretu mlečne žlezde i predstavljaju više od 90% od ukupnih leukocita mlečne žlezde, dok su makrofagi najzastupljeniji u mleku zdrave mlečne žlezde (Pyörälä, 2003). Pored fagocitoze uzročnika infekcije, neutrofili oslobađaju i sintetišu laktoferin koji učestvuje u odbrani domaćina.

Laktoferin je gvožđe vezujući antimikrobni glikoprotein koji se nalazi u mleku i drugim sekretima. Koncentracija laktoferina u mleku krava je visoka tokom prvih dana posle partusa, perioda involucije mlečne žlezde i tokom mastitisa (Welty i sar., 1976; Sánchez i sar., 1988; Kawai i sar., 1999). Laktoferin ispoljava bakteriostatsko dejstvo

zahvaljujući njegovoj sposobnosti da vezuje jone gvožđa koji su neophodni za rast i razmnožavanje mnogih bakterija, kao i bakteriocidnu aktivnost koja rezultira direktnom interakcijom laktoferina i bakterije. Od otkrića i saznanja o antimikrobnim sposobnostima laktoferina protiv mnogih gram pozitivnih i gram negativnih bakterija, naučnici nastoje primeniti laktoferin u cilju terapije mastitisa. Tokom poslednjih godina, javio se problem povećanja rezistencije bakterija na antimikrobne lekove, što otežava lečenje bolesti, ali i ugrožava zdravlje životinja i ljudi. Najčešći uzroci toga su nepravilna upotreba i eventualna zloupotreba antimikrobnih lekova. Mnoga istraživanja su višena u *in vitro* i *in vivo* uslovima na primeni laktoferina samog ili u kombinaciji sa antibioticima u terapiji i prevenciji mastitisa krava (Kai i sar., 2002, Diarra i sar., 2003; Kutila i sar., 2004). Tokom intramamarnе aplikacije laktoferina i antibiotika uočen je sinergični efekat, ukazujući na efikasnost njihove kombinovane primene u terapiji infekcija sa patogenim bakterijama rezistentnim na antibiotike (Lacasse i sar., 2008).

Imajući u vidu poteškoće u identifikaciji krava sa subkličkim mastitisom i poremećenom sekrecijom vimena, kao i terapiji mastitisa, cilj istraživanja je procena dijagnostičke mogućnosti ultrazvučnog pregleda u detekciji subkličkog mastitisa i poremećene sekrecije vimena, kao i razmatranje opravdanosti primene laktoferina u prevenciji i lečenju ove bolesti u kombinaciji sa antimikrobnim lekovima.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Anatomska i histološka građa mlečne žlezde - *glandula lactifera*

Mlečna žlezda (*glandula mammae*) ili vime (*mamma, uber, mastos*) je složena tubuloalveolarna kožna žlezda sa apokrinim tipom sekrecije karakteristična za rod sisara čija je primarna uloga u ishrani novorođenčadi (Boboš i Vidić, 2005). Ona je simetričan organ i nalazi se kod životinja na ventralnom delu trbušnog zida levo i desno od medijalne ravni - u ingvinalnom (krave, ovce, koze, kobile i ženka kita), torakalnom (primati i ženke slona) i abdominotorakalnom području (krmače, glodari i mesojedi) (Duke, 1993). Vime krave je vrlo dobro razvijeno i nalazi se u ingvinalnoj regiji. Fiksirano je za ventralni deo trbušnog zida pomoću kože, površinske i duboke fascije i *ligamentum suspensorium mammae* koji se pruža medijano i deli vime na polovine (Bath i sar., 1985). U visokomlečnih krava, vime je dobro razvijeno i dopire kranijalno do blizu pupka, a kaudalno se nalazi delom između zadnjih ekstremiteta.

Mlečna žlezda je kod životinja ženskog pola potpuno razvijena (*mamma feminine*) i predstavlja akcesornu polnu žlezdu, dok je u mužjaka (*mamma musculina*) rudimentisana i nefunkcionalna.

Mlečna žlezda se sastoji od mamarnih kompleksa. Broj mamarnih kompleksa je karakterističan za svaku vrstu domaćih životinja, a može da varira i u iste vrste. Pored normalno razvijenih, može da se nađe po jedna ili više rudimentisanih kompleksa. Vime

krava se sastoji od četiri mamarna kompleksa, a ređe ih ima i više. Jedan mamarni kompleks odgovara jednoj četvrtini vimena, te se razlikuju dve prednje i dve zadnje četvrtine, leva i desna. Pomoću vezivnog tkiva, svaka četvrt je odvojena i pregrađena od drugih i ima poseban sistem prikupljanja mleka. I pored postojanja četiri mamarna kompleksa, vime krava ima izgled jedinstvenog organa koji je spolja podeljen jednim medijalnim žlebom - *sulcus intermammarius* (Frandsen i sar., 2009).

Mamarni kompleks se sastoji iz žlezdanog tela (*corpus mammae*) i sise (*papilla mammae*). U oba ova dela nalazi se zajednički sistem kanala.

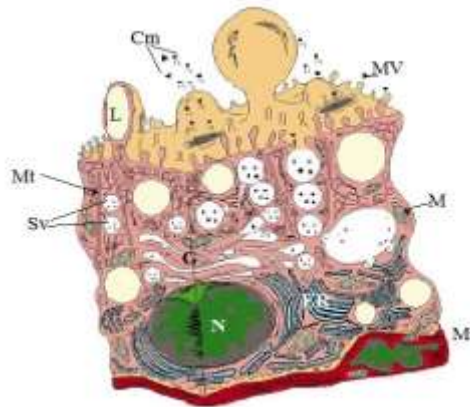
1. Mamarno telo (*corpus mammae*) ili žlezdano tkivo se sastoji iz žlezdanog parenhima (*glandula mammaria*) i intersticijuma koji deli žlezdu na režnjiće - *lobuli mammae*, a obloženo je fascijama i kožom. Baza ovog tela je fiksirana za ventralni zid abdomena. Ventralni deo žlezdanog tela se smanjuje i završava u vidu izbočenja na koje se nastavlja sisa.

U svakom režnjiću mlečne žlezde nalaze se interlobularni kanali koji se završavaju sekretornim (mlečnim) alveolama koje su osnovna strukturna i funkcionalna jedinica žlezdanog parenhima vimena.

Kanali su obloženi prizmatičnim epitelnim ćelijama, ispod njih se često nalaze mioepitelne ćelije i bazalna membrana. Kanali užeg promera se ulivaju u šire kanale, a veći izvodni kanali obloženi su često i dvoslojnim prizmatičnim epitelom koji nema sekretornu ulogu.

Svaki režnjić ima 150-220 mikroskopskih alveola promera 50-250 µm koji zavisi od količine deponovanog mleka (Nickerson i Akers, 2002; Boboš i Vidić, 2005). Zid alveola se sastoji od epitela koji je okružen mioepitelnim ćelijama i bazalnom membranom. Alveola je zasebna jedinica sinteze i sekrecije mleka.

Epitel alveola je nisko prizmatičan u acinusima koji su relativno neaktivni. U toku stimulacije ovih ćelija, u epitelu se sintetišu proteini, masti i ugljeni hidrati. U ovoj fazi aktivne biosinteze uvećava se visina epitela za više od 10 puta, ćelije postaju visoko prizmatične, apikalna površina citoplazme strči u lumen alveola. U toku aktivne sekrecije površina citoplazme prska i proizvodi aktivnosti dospevaju u lumen alveola.



**Slika 1.** Šematski prikaz epitelne ćelije mlečne alveole (Nickerson i Akers, 2002)

N - nukleus, ER - granulisani endoplazmatični retikulum, G - goldžijev aparat, Sv - sekretorne vezikule, M - mitohondrije, Mv - mikrovili, Mt - mikrotubuli, Mi - mioepitelne ćelije, Cm - kazeinske micelle, L - lipidna kapljica

Alveolarne epitelne ćelije sadrže sve neophodne organele kako bi konvertovali prekursora preuzetih iz krvi u odgovarajuće sastojke mleka (Slika 1). Ovi prekursori izlaze iz krvi i ulaze u ekstracelularnu tečnost koja se nalazi između kapilara i epitelnih ćelija. Potom, prolaze kroz bazalnu membranu ćelija i podležu odgovarajućoj sintezi. Proteini mleka, prvenstveno kazein, proizvode se iz aminokiselina preuzetih iz krvi. Kazein se sintetiše u granulisanom endoplazmatičnom retikulumu i transportuje u goldžijev aparat gde se priprema za dalji transport iz ćelija u vidu sekretornih vezikula. Laktoza se sintetiše u goldžijevom kompleksu i zajedno sa proteinima mleka transportuje ka apikalnoj membrani ćelija preko sekretornih vezikula (kesica). Tamo, membrana sekretornih vezikula se spaja sa unutrašnjom površinom apikalne membrane, pri čemu nastaje otvor kroz koji komponente sekretornih vezikula bivaju izbačeni u lumen alveola (Larson, 1979, 1995). Sekretacija magnezijuma, kalcijuma, kao i drugih jona se isto vrši preko sekretornih vezikula poreklom iz goldžijevog aparata. Trigliceridi mlečne masti su sintetizovani na granulisanom endoplazmatičnom retikulumu. Brojne male kapljice masti se udružuju međusobno čineći veće kapljice, koje se kreću ka apikalnoj membrani ćelije.

Mioepitelne ćelije su specijalizovane i imaju kontraktilnu ulogu. Kontraksije ovih ćelija nastaju pod dejstvom oksitocina, kao oktapeptida, koji se sintetiše u neurosekretornim ćelijama hipotalamusa (Bruchmaier i Blum, 1998). Povećana



koncentracija ovog hormona izaziva kontrakciju mioepitelnih ćelija i utiče na pojačano lučenje mleka iz alveola prema izvodnim kanalima (Pantić, 1995). Sa spoljašnje strane mioepitelnih ćelija, alveola je obavijena vezivnotkivnom membranom. Kapilarni deo van alveola je deo osnovnog tkiva koji se nalazi između alveola.

Intersticijum mlečne žlezde se sastoji od vezivnih ćelija, kolagena, elastičnih vlakana, krvnih i limfnih sudova, nervnih vlakana i glatko mišićnih ćelija.

2. Sisa (*papilla mammae*) predstavlja ventralni i znatno uži deo mamarnog kompleksa. U nekih domaćih životinja je valjkastog, a u drugih bradavičastog oblika sa zaobljenim vrhom. Na vrhu sise se nalaze jedan ili više malih otvora - *ostium papillare*. Sise vimena krava su valjkaste i slabo nagnute u ventrokranijalnom pravcu. Na sisama krava nema dlaka, znojnih i lojnih žlezda, a njihova veličina i oblik zavisi od veličine i oblika vimena, kao i proizvodnje mleka. Iako su prednje papile uglavnom duže od zadnjih, kapacitet zadnjih sisa je znatno veći od prednjih (60:40) (Hurley, 1997). Sisa dobre mlekulje je duga 6-10 cm (Boboš i Vidić, 2005., Avdić i sar., 2008). Pored četiri dobro razvijene sise, mogu da se nađu još po jedna, dve, ređe tri, a sasvim izuzetno i četiri akcesorne sise i to najčešće na zadnjim četvrtima vimena (40% krava poseduje pseudo papile). Ove pseudo papile nemaju izvodni kanal, tako da nisu povezane sa unutrašnjošću same žlezde. Nekada, uz akcesorne sise može da bude razvijen i žlezdani parenhim, ali je uvek znatno manji od žlezdanog tela jednog od četiri normalno razvijena mamarna kompleksa. Akcesorne sise mogu biti inficirane bakterijama koje dovode do mastitisa te se uglavnom odstrane do prve godine starosti životinja. Na vrhu sise krava nalazi se samo jedan otvor. Papila je izgrađena od tri sloja: spoljašnji sloj - koža sa elastičnim tkivom, središnji sloj - vezivno tkivo sa glatkomišićnim vlaknima i unutrašnji sloj - tanka sluzokoža.

Šupljinu jednog mamarnog kompleksa čine mlečni putevi, mlečna cisterna i kanal sise. Mleko iz alveola se transportuje kroz kanaliće koji se zatim udružuju u veće kanale *ductuli lactiferi*. Potom, oni čine veće kanale preko kojih se mleko izliva u mlečnu cisternu.

Mlečna ili žlezdana cisterna (*sinus lactiferus*) je najširi i najrasprostranjeniji deo šupljeg dela mamarnog kompleksa koji služi kao rezervoar za sakupljanje mleka.

Mlečna cisterna se nalazi unutar sise i žlezdanog tela, što znači da jednim delom leži u sisi, a drugim u parenhimu mlečne žlezde te se tako razlikuje sisni i žlezdani deo. Žlezdani deo cisterne je znatno širi i obrazuje veliki broj većih ili manjih izbočina čiji stepen nabranosti zavisi od njene ispunjenosti mlekom. U mlečnu cisternu ulivaju se kanali koji dovode mleko iz mamarnog tela, a ona se direktno i neprimetno nadovezuje na sisnu cisternu. Na granici između sisne i žlezdane cisterne nalaze se krikoidni prstenovi (*annular folds*) (Nickerson i Akers, 2002; Boboš i Vidić, 2005). Sluzokoža mlečne cisterne se sastoji od dvoslojnog prizmatičnog epitela i krzna.

Sisni kanal (*ductus papillaris*) nalazi se na vrhu sise i predstavlja krajnji izvodni deo kanala šupljeg sistema mamarnog kompleksa. Ovaj kanal je kratak i relativno uzan, a u krava je dužine oko 8-12 mm, prečnika 0,4 mm na distalnom i 0,77 mm na proksimalnom kraju, koji se povećava sa povećanjem broja laktacija (Bath i sar., 1985). Mnogi autori ukazuju da na dužinu i promer *ductus papillaris*-a utiču različiti spoljašnji i unutrašnji parametri kao što su rasa (Klein i sar., 2005), broj laktacija (Hamann i Mein, 1988), stadijum laktacije (McDonald, 1973, 1975) i tehnologija muže (Haman i sar., 1994; Neujenhuis i sar., 2001). Spoljni otvor ovog kanala (*ostium papillare*) nalazi se na samom vrhu sise. Sisni kanal je obložen kutanom sluzokožom koja obrazuje mnoge nabore i na spoljašnjem otvoru prelazi u kožu. Nabor sluzokože u sisnom kanalu kod krava naziva se Firstenbergova rozeta (*Furstenberg's Rosette*) čija je uloga da potpuno zatvori sisni kanal između dve muže. U zidu ovog kanala se nalazi cirkulatorni sistem mišićnih ćelija i elastičnih vlakana - *m. sphincter papillae* (Alvin 1977, Boboš i Vidić, 2005, Avdić 2007). Ovaj kružni sfinkter omogućava da mleko za vreme muže i sisanja prolazi u mlazevima kroz sisni kanal napolje.

Mlečnu žlezdu spolja oblaže koža koja je fina, elastična i meka, a obrasla je nežnim i retkim dlakama lokalizovanim uglavnom na bazi vimena.

Vime je vrlo dobro snabdeveno krvlju što je od izuzetnog značaja, jer svi prekursori mleka vode poreklo iz krvi. Krv dovode *a. pudenda externa* i *a. perinealis*, a odvode je tri vene i to: *v. subcutis abdominalis*, *v. pudenda externa* i *v. perinealis*. *V. subcutis abdominalis* odvodi krv iz mlečne žlezde u kranijalnom pravcu. Ova vena se nalazi neposredno ispod kože na ventralnom trbušnom zidu, široka je i vijugava, vrlo dobro razvijena u dobrim mlekulja, pa se još označava kao mlečna vena. Veličina

protoka krvi kroz vime zavisi od funkcionalnog stanja mlečne žlezde i stepena proizvodnje mleka. U punoj laktaciji protok krvi kroz mlečnu žlezdu je najveći i prema podacima Homan i Wattiaux (1995) za proizvodnju 1 kg mleka potrebno je da kroz vime krava prođe 400-500 kg krvi. Pored dobro razvijenog krvotoka, mlečna žlezda ima i bogato razvijenu mrežu limfnih sudova, pri čemu limfa iz vimena prolazi kroz supramamarne limfne čvorove. Mlečna žlezda je inervisana granama *n. spermaticus externus* i *Nn. Ilioinquinales* i *Nn. Iliohypogastrici*, a u njoj se nalaze i vlakna *n. simpaticus*.

## 2.2. Klinički pregled vimena krava

U cilju očuvanja zdravlja vimena krava, na farmama visokomlečnih krava, kao rutinska metoda, izvodi se klinički pregled vimena. Klinički pregled vimena krava je jednostavna, brza i ekonomična metoda koja se izvodi svakodnevno pri čemu pruža vredne informacije o zdravstvenom statusu životinje (Klaas i sar., 2004). Klinički pregled sastoji se u proceni opšteg zdravstvenog stanja životinja, kao i ispitivanju mlečne žlezde adspekcijom i palpacijom. Adspekcijom se posmatra vime sa svih strana kako bi se utvrdio oblik i veličina vimena, simetrija parnih četvrti i promene na koži vimena i sisa. Palpacija se najčešće izvodi posle muže, pri čemu se pregleda svaka pojedinačna četvrt vimena od vrha papile vimena do parenhima vimena. Posebna pažnja se obraća pri pregledu supramamarnih limfnih čvorova. Pregled krava sa bolnim vimenom može biti otežan, pa je neophodno fiksirati životinju kako bi se izbegle povrede. Prilikom pregleda potrebno je obezbediti dobro osvetljenje da bi se abnormalnosti na vimenu lakše uočile.

### 2.2.1. Pregled suspenzornog sistema vimena

Klinički pregled vimena krava započinje evaluacijom njenog suspenzornog sistema. Posmatra se anatomske položaj vimena, kao i njegove konture sa bočne i zadnje strane životinje u cilju otkrivanja promena uzrokovanih rupturom suspenzornih ligamenata vimena. Adspekcijom se može lako uočiti ruptura medijalnog i lateralnog ligamenta (Slika 2). Ruptura medijalnog ligamenta je češća, pri čemu se može uočiti bočna dislokacija desne i leve polovine vimena. Papile mlečne žlezde nisu paralelne, već su razmaknute. Krave sa rupturom medijalnog ligamenta se prevremeno isključuju

iz proizvodnje zbog otežane muže. Kod rupture lateralnog suspenzornog ligamenta dolazi do drastičnog spuštanja vimena, tako da se vime nalazi u visini skočnog zgloba životinje (Jackson i Cockcroft, 2002).



**Slika 2.** Povreda suspenzornih ligamenata vimena (Orig.)

Oštećenja suspenzornog sistema vimena predstavljaju predispoziciju za nastanak edema vimena, mehaničkih oštećenja papile vimena i infekcija (Boboš i Vidić, 2005). Mehanička oštećenja papile vimena nastaju najčešće nagazom na papilu, pri čemu dolazi do gubitka njene funkcije, odnosno primarnog odbrambenog mehanizma što olakšava nastanak intramamarnih infekcija. Ruptura medijalnog i lateralnog ligamenta se može uočiti kod starijih visokoproduktivnih krava.

### **2.2.2. Pregled kože vimena krava**

Ispitivanje stanja kože vimena i sisa vrši se adspekcijom i palpacijom. Najčešće promene koje se mogu uočiti na parenhimu vimena su edemi vimena, impetigo i intertrigo vimena. Edem vimena može biti fiziološke i patološke prirode. Fiziološki edem se često javlja kod prvotelkinja i to dve do četiri nedelje pre telenja, pri čemu vime može biti bolno (Boboš i Vidić, 2005). Patološki edem traje duže i može perzistirati nekoliko meseci posle partusa ili tokom celog laktacionog perioda. Tendencija nastanka ovog edema povećava se kod krava sa oštećenjem suspenzornog sistema vimena, ali i obrnuto, patološki edem vimena krava može doprineti rupturi njenih suspenzornih ligamenata (George i sar., 2008). Edem vimena najčešće se može uočiti na zadnjim četvrtima, iako može da zahvati sve četvrti. Kod težih slučajeva, edem

može da se proširi uz ventralni zid kranijano ka grudima. Vime je uvećano, mekane ili čvrste konzistencije, a koža crvena, zategnuta i sjajna (Slika 3). Životinja oseća nelagodnost i bolnost tokom pokreta zbog pomeranja edematoznog vimena i iritacije. Papile vimena su nepromenjene, ali zbog edema izgledaju kraće. Uzroci nastanka edema vimena se mnogobrojni: tromboza kaudalne šuplje vene i vena mlečne žlezde, kardijani problemi, postpartalni metritis, hipoproteinemija itd. Prekomeran unos natrijuma tokom perioda zasušenja je jedan od faktora koji dovode do nastanka otoka koji, najčešće sa pojavom laktacije, nestaje.



**Slika 3.** Edem vimena krava (Orig.)

Impetigo vimena (superficialni pustularni dermatitis) javlja se tokom letnjih meseci, kad su visoke temperature i velika vlažnost vazduha. Na koži vimena krava zapažaju se male, crvene superficialne pustule koje mogu dovesti do eksudativnog dermatitisa i širenja procesa na papilu vimena. Pustule mogu da prsnu te nastaju erozije prekrivene krastama žućkaste boje. Kod težih slučajeva, mogu se palpirati uvećani regionalni limfni čvorovi. Impetigo nastaje infekcijom koagulaza pozitivnih stafilokoka.

Intertrigo (ulcerozni dermatitis vimena) se može zapaziti kod krava sa opuštrenom mlečnom žlezdom, kao i kod krava sa otokom vimena između desne i leve polovine vimena ili između vimena i noge životinje. Koža vimena je crvena i bolna sa pojavom gnojnih mehurića neprijatnog mirisa zahvaćeni nekrozom (Blowey i Weaver, 2011).

### 2.2.3. Pregled sisa vimena krava

Kliničkim pregledom sisa vimena najčešće se mogu uočiti akcesorne sise i nefunkcionalne sise, kao kongenitalna stanja. Akcesorne sise (pseudo papile) poseduju tanji sisni zid i kraće su u odnosu na prave sise vimena. Najčešće se mogu uočiti na zadnjim četvrtima vimena ili između prednjih i zadnjih sisa vimena (Slika 4). Pseudo papile mogu biti povezane sa bazom normalno razvijene papile („sijamske“ papile), odnosno sa njihovom sisnom cisternom. Nefunkcionalne papile mogu biti urođena anomalija, pri čemu papila vimena ne poseduje sisni kanal iako je razvijena sisna cisterna ili da postoji membrana između sisnog kanala i cisterne. U takvim slučajevima, mleko se ne može palpirati u sisi vimena krava (Blowey i Weaver, 2011).



**Slika 4.** Akcesorne sise vimena krava (Orig.)

Pored urođenih anomalija papile vimena, kliničkim pregledom se često mogu uočiti lezije na papilama vimena krava, pri čemu se mora utvrditi stepen oštećenja. Povrede vrha sisa mogu nastati zbog nagaza na nju od strane susednih životinja ili od same životinje koje poseduju opuštenu vime, edem vimena ili oslabljen suspenzorni sistem vimena, pri čemu mogu biti oštećeni sisni kanal i *m. sphincter papillae* (Slika 5). Akutne povrede dovode do inflamacije, hemoragije i edema distalnih delova papile vimena. Lezije na sisnom kanalu olakšavaju prodor i kolonizaciju mikroorganizama u vime (Neijehnuis i sar., 2000; Shearer i sar., 2004) što dovodi do nastanka intramamarnih infekcija. Adspekcijom se lako može uočiti otok mekog tkiva papile vimena, koža je hiperemična ili oderana na mestu povrede. Životinja ispoljava znake bola što onemogućava mužu.



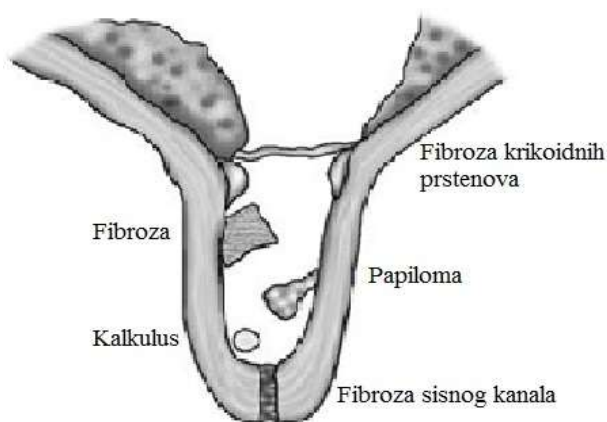
**Slika 5.** Mehanička povreda papile vimena (Orig.)

Lezije na papili vimena mogu nastati i zbog nepodesne muže, pri čemu dolazi do poremećaja u cirkulaciji krvi i limfe kroz papilu i nastanka edema i hiperkeratoze. Kod težih slučajeva može doći do subkutanih hemoragija i prolapsa tkiva sisnog kanala (Shearer i sar., 2004). Hiperkeratoza papile vimena se češće javlja tokom prve i druge faze laktacije. Oporavak je moguć tokom perioda zasušenja, ali povrede tokom naredne laktacije ponovno dovode do razvoja hiperkeratoze sa kumulativnim efektom (Blowey i Weaver, 2011). Adspekcijom se lako može otkriti hiperkeratoza papile vimena krava. Za procenu stepena hiperkeratoze papile vimena koriste se dva sistema. Po prvom, hiperkeratoza se ocenjuje od 0 do 5, gde 0 predstavlja normalnu papilu, a 5 ozbiljne promene na njoj. Drugi sistem procenjivanja hiperkeratoze je na osnovu pojave prstena na papili vimena, te postoje sledeći oblici hiperkeratoze: „glatki prsten“ (*smooth ring*), „grub prsten“ (*rough ring*) i „veoma grub prsten“ (*very rough ring*) (Slika 6). Traume nastale mašinskom mužom mogu da se uoče kao suva, kružna krvarenja oko sisnog otvora, a sama papila vimena je čvrsta i otečena. Hiperkeratoza papile vimena predstavlja predispoziciju za nastanak intramamarnih infekcija kako u periodu laktacije tako i tokom zasušenja. Istraživanja u Americi ukazuju da hiperkeratoza papile vimena može dovesti do nastanka novih infekcija vimena samo u slučaju pojave erozija i krasta na papili (Shearer i sar., 2004).



**Slika 6.** Hiperkeratoza papile vimena (5 stepen keratinizacije) (Blowey i Weaver, 2011)

Palpacijom vimena može se utvrditi opstrukcija papile vimena koja može biti delimična ili potpuna. Papila vimena može biti opstruirana u bazalnom, medijalnom i apikalnom delu. Lezije sisne cisterne mogu dovesti do njene opstrukcije, te je onemogućen protok mleka. Opstrukciju sisne cisterne mogu izazvati kalkulusi, neoplazne (papilomi) i hronični inflamatorni procesi (Slika 7). Tokom akutnih povreda sisa vimena nastaje otok što posledično može dovesti do privremene opstrukcije sisne cisterne. Sa oporavkom tkiva i opstrukcija sisne cisterne nestaje.



**Slika 7.** Opstrukcija papile vimena (Jackson i Cockcroft, 2002)

Kod opstrukcije bazalnog dela papile vimena onemogućen je protok mleka iz mlečne cisterne u sisnu cisternu tako da je cisterna sise prazna. Opstrukcija najčešće nastaje kao posledica hroničnih inflamatornih procesa tokom infekcija u periodu zasušenja vimena, pri čemu je nastala adhezija krikoidnih prstenova. Opstrukcija medijalnog dela papile vimena može nastati kao rezultat pojave neoplazmi, kalkulusa, kao i hroničnih inflamacija. Kod apikalne opstrukcije papile, sisni kanal može biti delimično ili potpuno začepljen kao posledica fibroze i stenoze kanala. Sisna cisterna je



ispunjena mlekom. Dijagnoza opstrukcije papile vimena se lako postavlja na osnovu anamneze, adspekcije i palpacije. Palpacijom sisa vimena može se lako odrediti da li se radi o delimičnoj ili potpunoj neprohodnosti papile. Ako opstrukcija nije nastala nedavnom traumom, proces je bezbolan.

U poslednjih dvadeset godina, ultrasonografija vimena dopunjuje klasičan klinički pregled i olakšava dijagnostikovanje promena na parenhimu i papili vimena (Makek, 1995).

### **2.3. Ultrazvučna vizualizacija mlečne žlezde, kao i njen značaj u otkrivanju poremećene sekrecije vimena**

Ultrazvuk je jednostavno primenljiva, moderna i neinvazivna metoda koja omogućava vizualizaciju strukture mlečne žlezde (parenhim, mlečnu i sisnu cisternu, zid papile, Firstenbergovu rozetu, sisni kanal), kao i njene patomorfološke promene (stenoza i opstrukcija sisnog kanala, mastitis, edem, apces, hematom, tumori, strana tela u parenhimu vimena). U odnosu na klinički pregled vimena, ultrazvuk je objektivnija metoda.

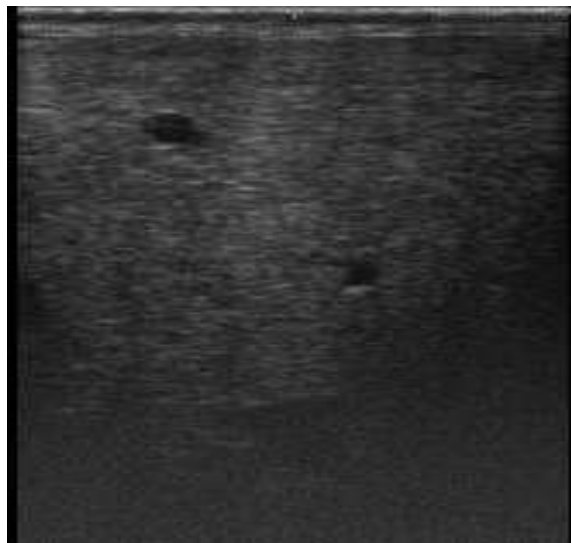
Za razliku od humane medicine gde ultrasonografija mlečne žlezde, pored mamografije, predstavlja rutinsku metodu pregleda koja pruža dodatne informacije o njenom zdravstvenom statusu, podaci o ultrazvučnim karakteristikama parenhima mlečne žlezde krava su oskudni. Flöck i Winter (2004) navode da se svega nekoliko autora bavilo ovom problematikom, iako su pojava patoloških promena u parenhimu vimena sve zastupljenija.

Prvobitno, ultrazvučna dijagnostika je u veterinarskoj medicini našla primenu u ranom otkrivanju graviditeta kod životinja, određivanju pola i starosti ploda i ovarijalnih struktura. Caruolo i Mochrie (1967) su prvi put obavili ultrazvučno snimanje papile vimena krava, pri čemu su koristili ultrazvučni aparat u A modu i sondu od 1 MHz. Primenu ultrasonografije mlečne žlezde krava u B modu uradili su 1986 godine Cartee i sar. korišćenjem linearne (5 MHz) i sektorske (10 MHz) sonde ispitivajući strukturne promene u papilama vimena i poremećaj sekrecije vimena krava (1986). U odnosu na druge dijagnostičke metode ispitivanja vimena krava, ultrazvuk se pokazao kao bolja

metoda. Tokom 70-ih i 80-ih godina prošlog veka, papilarna radiografija se primenjivala u otkrivanju poremećaja sekrecije vimena (Witzig i Hugelshofer, 1984; Alacam i sar., 1990). Ovu metodu je zamenila ultrasonografija kao neinvazivna metoda koja omogućava vizualizaciju pojedinačnih struktura mlečne žlezde krava (parenhima i papile) i endoskopija sisa (teleskopija). Teleskopija je značajna metoda u otkrivanju patoloških promena, ali ona omogućava vizualizaciju samo papilarnog dela mlečne cisterne i sisnog kanala, dok se proksimalne strukture vimena ne mogu uočiti (Fasulkov, 2012; Szencziová i Strapák, 2012). Velika prednost teleskopije u odnosu na druge metode jeste verodostojan prikaz patoloških promena.

### **2.3.1. Ultrazvučna vizualizacija parenhima i papile zdrave mlečne žlezde krava**

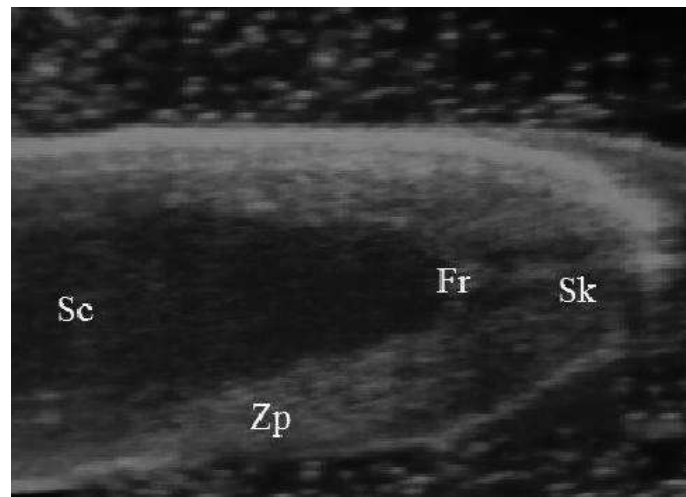
Ehogenost mlečne žlezde kod krava u laktaciji zavisi od njene punjenosti sa mlekom. Isto tako, ultrazvučna vizualizacija sisnog kanala moguća je samo kada je ona ispunjena mlekom (Franz i sar., 2009). Parenhim zdrave mlečne žlezde primećuje se ultrazvučno kao homogena, hiperehogena struktura sa anehogenim područjima koja odgovaraju krvnim sudovima i kanalikularnom sistemu parenhima vimena (Ayadi i sar., 2003; Flöck i Winter, 2006; Nishimura i sar., 2010). Mleko u mlečnoj cisterni prikazuje se kao anehogena formacija koja može da sadrži male ehogene partikule (Slika 8). Step en ehogenosti mlečne žlezde u laktaciji zavisi od njene punjenosti sa mlekom.



**Slika 8.** Ultrazvučni prikaz parenhima vimena krava (Orig.)

Mlečna cisterna uočava se kao velika homogena anehogena struktura okružena sa hiperehogenom linijom koja predstavlja mukoznu membranu. Prelaz mlečne cisterne u cisternu sise se ultrazvučno identifikuje prisustvom velike i okrugle anehogene zone u sisnom zidu koja predstavlja velike krvne sudove (Cartee i sar., 1986; Franz i sar., 2009; Hallowell, 2012).

Ultrasonografija omogućava vizualizaciju svih mekotkivnih struktura mlečne žlezde, kako sekretornog parenhima, tako i sisa vimena (Slika 9). Zahvaljujući ovoj metodi, mogu se diferencirati slojevi sisnog zida, pri čemu se koža sise uočava kao hiperehoga linija promera 1-2 mm, vezivnotkivni i mišićni sloj kao homogena hipoehogena struktura sa anehogenim poljima koji odgovaraju kapilarima, i unutrašnji sloj, sluzokoža, koja se prikazuje kao tanka i svetla - hiperehoga linija (Fasulkov, 2012). *Stratum corneum* sisnog kanala sa keratinom uočava se kao tanka, beličasta, hiperehoga linija, okružen sa paralelnim anehogenim trakama koje predstavljaju *stratum granulosum*. Na prelazu između sisnog kanala i cisterne sise nalazi se homogena, hiperehoga struktura Firstenbergova rozeta (Franz i sar., 2009, Szencziova i Strapak, 2012). Sisna cisterna je anehoga struktura okružena hiperehogenom sluzokožom.



**Slika 9.** Ultrazvučni prikaz sise mlečne žlezde krava (Galfi i sar., 2015a)  
Sk - sisni kanal, Sc - sisna cisterna, Zp - zid papile, Fr - Firstenbergova rozeta

Kod ultrazvučnog pregleda vimena krava, posebna pažnja se obraća i limfnim čvorovima vimena koji se nalaze dorzokaudalno na bazi vimena. Supramamarni limfni

čvorovi se nalaze superficijalno, oko 0,5-2 cm ispod kože, sa desne i leve strane vimena (Bradley i sar., 2001). Obično ih ima dva sa po svake strane vimena. Limfni čvor sa lateralne strane je veći i po obliku podseća na bubrege, dok su medijalni limfni čvorovi manji, ovalnog oblika i smešteni dublje. Ultrasonografija omogućava njihovu jednostavnu vizualizaciju. Od okolnom masnog tkiva i parenhima vimena, limfni čvorovi su odvojeni ehogenom kapsulom. Parenhim, odnosno korteks limfnog čvora uočava se kao homogena, hipoehogena struktura u čijem središnjem delu se nalazi hiperehogeno polje koje odgovara hilusu (Slika 10).



**Slika 10.** Ultrazvučni prikaz limfnog čvora vimena krava (Orig.)

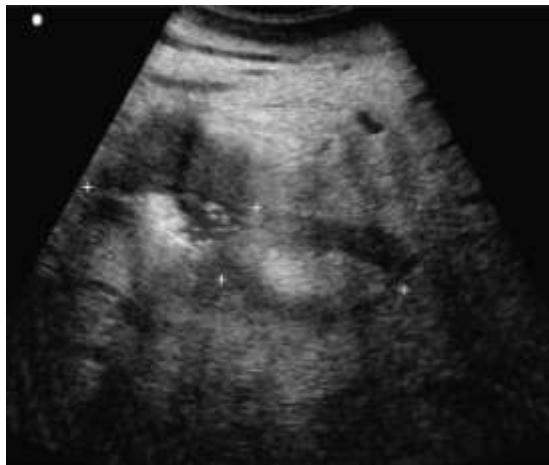
Ka - kapsula, Ko - korteks, Hi - hilus

### **2.3.2. Ultrazvučna vizualizacija parenhima i papile mlečne žlezde sa patomorfološkim promenama**

Brza i tačna dijagnoza oboljenja mlečne žlezde je od presudnog značaja kako bi se smanjili ekonomski gubici. Prvi korak jeste klinički pregled životinje, koji se u poslednje vreme sve češće dopunjuje ultrazvučnom dijagnostikom. Mnoge patološke promene vimena se mogu ultrazvučno dijagnostikovati i diferencirati, ali ultrazvuk ne može da zameni bakteriološko ispitivanje uzoraka mleka i određivanje broja somatskih ćelija mleka u dijagnostici mastitisa (Flöck i Winter, 2006; Franz i sar., 2009).

Ultrasonografija omogućava jednostavnu dijagnostiku apscesa i hematoma mlečne žlezde, subkutanog edema, kao i nakupljanje gasa u žlezdanom parenhimu. Na

ultrazvučnom snimku, apsces mlečne žlezde se uočava kao okrugla, jasno definisana struktura različite veličine sa izraženom kapsulom (Slika 11). Najčešće je ispunjena nehomogenim hipoehogenim ili hiperehogenim sadržajem. Hiperehogene promene nastaju zbog nekroze zahvaćenog tkiva i formiranja gasa.



**Slika 11.** Apsces žlezdanog parenhima vimena krava (Flöck i Winter, 2006)

Hematom parenhima mlečne žlezde prikazuje se kao veliko anehogeno ili hipoehogeno područje sa tankim ehogenim septama (pregradama) koje se pomeraju ili prisustvo većih ugrušaka. Može se primetiti kompresija žlezdanog parenhima od strane hematoma što povećava ehogenost. Svež hematom je anehogen i poseduje glatku granicu ka okolnom tkivu, često nepravilnog oblika, dok starija krvarenja gube anehogenost i postaju hipoehogeni sa hiperehogenim stukturama u vidu grudvica ili traka (Slika 12).



**Slika 12.** Hematom žlezdanog parenhima vimena krava (Flöck i Winter, 2006)

Tokom formiranja gasa u parenhimu vimena krava, kao i subkutanog edema, parenhim se ultrazvučno vizualizuje kao nehomogena struktura sa hiperehogenim zonama koje predstavljaju nakupine gasa. Edem vimena daje nepravilnu ehogenost tkiva gde se naizmenično smenjuje ehogenost vezivnog tkiva i anehogenost prostora ispunjenog sa edematoznim sadržajem.

Ultrazvučni nalaz vimena krava u slučaju mastitisa zavisi od stepena strukturnih promena koje se pojavljuju u tkivu. Parenhim vimena se najčešće uočava kao nehomogena struktura, pri čemu ehogenost može biti smanjena ili povećana. U nekim slučajevima oboljenja, parenhim može imati normalan ultrazvučni prikaz, kao kod infekcije vimena koagulaza negativnim stafilokokama (Franz i sar., 2009). Flöck i Winter (2006) su ukazali da infekcije vimena krava sa određenim uzročnicima mastitisa mogu dati karakterističan ultrazvučni nalaz. U parenhimu vimena krava inficiranih sa bakterijom *Arcanobacterium pyogenes* mogu se uočiti hipoehogena ograničena polja sa malim hiperehogenim centrom (Slika 13). Kod piogenih infekcija, mlečna alveola se uočava kao anehogena zona ispunjena sa homogenim hipoehogenim sadržajem, dok u slučaju kliničkog mastitisa sa *Staphylococcus aureus*, alveola sadrži hipoehogen sadržaj sa hiperehogenim tragovima (Kotb i sar., 2014). Fasulkov i sar. (2015) navode da infekcija vimena sa *Staphylococcus aureus* kod malih preživara se ultrazvučno lako može dijagnostikovati nalazom velikih hiperehogenih zona u nehomogenom parenhimu vimena sa nemogućnošću vizualizacije krvnih sudova vimena, kao i promena u dijametru sisnog kanala.



**Slika 13.** Parenhim vimena krava inficiranih sa bakterijom *Arcanobacterium pyogenes*

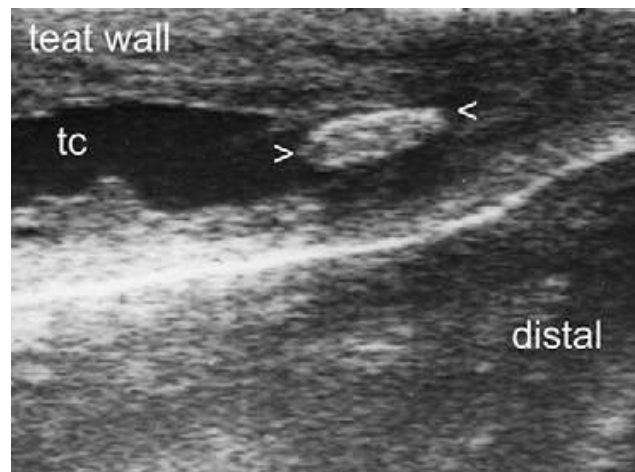
(Flöck i Winter, 2006)

[20]

Ultrasonografija vimena krava sa subkliničkim mastitisom ukazuje na nepravilne konture sisnog kanala i cisterne sa nemogućnošću raspoznavanja slojeva papilarnog zida. Sisna cisterna je neznatno hipoehogena u odnosu na njeno fiziološko stanje kada se ultrazvučno vizualizuje kao anehogena struktura (Javadi i Acorda, 2011). Pre muže, mlečne alveole se uočavaju kao anehogene strukture sa izraženim hipoehogenim poljima, pri čemu se ehogenost povećava nakon izmuzavanja.

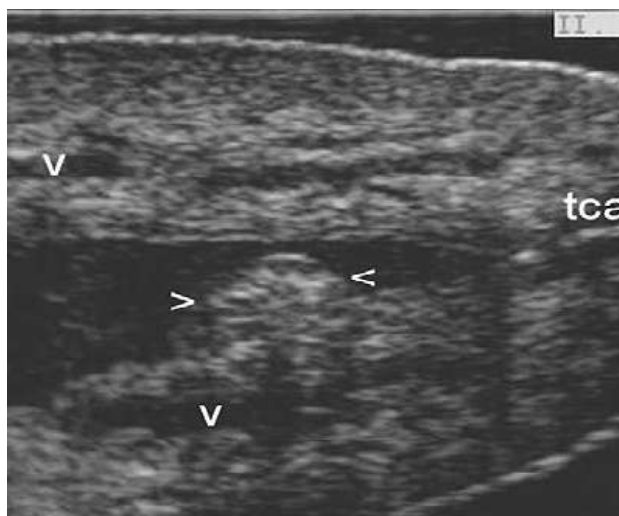
Kod kliničke forme mastitisa, ultrazvučnom vizualizacijom, uočava se istanjenost i gubitak troslojnog izgleda sisnog zida, kao i potpuna opstrukcija sisnog kanala sa gubitkom Firstenbergove rozete. Sisna cisterna je nepravilnog izgleda ispunjena sa homogenim hipoehogenim mlekom. Povećanje ehogenosti mleka u mlečnoj i sisnoj cisterni je posledica povećanja broja ćelija mleka.

Najčešće patološke promene u sisnoj cisterni koje se mogu dijagnostikovati ultrazvukom su inflamacije, lezije mukoze, tkivne proliferacije, prisustvo kalkulusa i stranih tela. Tokom inflamacije, sluzokoža sisne cisterne je istanjena i nepravilne konture, dok je vezivnotkivni i mišićni sloj nehomogen pri čemu se uočava povećanje dijametra krvnih sudova (Franz i sar., 2009). Kalkulusi u sisnoj cisterni mogu biti slobodni ili vezani za sluzokožu, pri čemu dovode do potpune ili delimične opstrukcije papile vimena, a na ultrazvučnom snimku uočavaju se kao ehogene strukture, jasno ograničene i različite veličine (Slika 14).



**Slika 14.** Prisustvo kalikulusa u sisnoj cisterni krave (Franz i sar., 2009)

Dinç i sar. (2000) su ukazali na značaj ultrasonografije u dijagnozi stenoze sisne cisterne i sisnog kanala u odnosu na klasičan klinički pregled papile vimena. Ultrazvuk omogućava brzo i jednostavno otkrivanje opstrukcije u predelu baze papile, sisne cisterne i Firstenbergove rozete, ali opstrukciju sisnog kanala je teže identifikovati, gde se klinički pregled pokazao efikasnijom metodom. Kod opstrukcije sisnog kanala može se uočiti istanjenost njenog zida, kao i nepravilne konture. Stenoza papile se najčešće vizualizuje kao hiperehogena struktura ali može biti i smanjene ehogenosti (Slika 15).



**Slika 15.** Opstrukcija sisne cisterne (Franz i sar., 2009)

Alteracije na zidu papile, kao što su hematomi i apscesi, mogu dovesti do poremećaja u protoku mleka. Hematom papile vimena se može identifikovati ultrazvučno kao hipoehogeno nehomogeno područje, dok apsces predstavlja ehogenu strukturu. Pored stečenih patoloških promena na papilama vimena, ultrasonografija olakšava dijagnostiku i diferencijaciju kongenitalnih anomalija, kao što su akcesorne sise.

Kod sumnje na postojanje mastitisa, pregledaju se supramamarni limfni čvorovi koji su kod mastičnih krava značajno uvećani (Bradley i sar., 2001; Khoramian i sar., 2015). Hussein i sar. (2015) navode da se tokom infekcije vimena sa koagulaza negativnim stafilokokama i *Staphylococcus aureus* može uočiti smanjenje ehogenosti hilusnog dela limfnog čvora. Bradley i sar. (2001) su utvrdili značajne promene u strukturi limfnih čvorova kod mastičnih krava u odnosu na zdrave jedinke. Ehogenost parenhima limfnog čvora kod mastičnih krava može biti promenjena, pri čemu se



može uočiti i nepravilna ehogenost hilusnog dela, koja tada postaje anehogena i hipoehogena sa hiperehogenim poljima.

## **2.4. Rast i razvoj mlečne žlezde**

Razviće mlečne žlezde reguliše aktivnost neuroendokrinog sistema. Pre nego što se uspostavi ravnoteža u međusobnim odnosima nervnog i endokrinog sistema, mlečna žlezda je infantilna (Boboš i Vidić, 2005).

Rast i razvoj mlečne žlezde započinje još u toku vrlo ranog embrionalnog razvoja, a posle rođenja, razvoj mlečne žlezde prolazi kroz fazu pre laktacije i fazu laktacije, pri čemu se ona strukturno i funkcionalno menja. Ceo proces rasta i razvoja mlečne žlezde može se podeliti u više faza.

### **2.4.1. Prenatalni - fetalni razvoj mlečne žlezde**

Razvoj mlečne žlezde kod krava započinje u ranom embrionalnom stadijumu uvrtnjem ćelija ektoderma u mezoderm sa ventralne strane abdomena neposredno iza pupka, pri čemu se formira jednoslojna nakupina ćelija (Malpigijev sloj). Kada je goveđi embrion star oko 30-35 dana (Akers, 2002) ćelije ektoderma se uvrću sa jedne i druge strane medijalne linije i sa okolnim ćelijama mezoderma formiraju mamarnu liniju. U ovom periodu nema razlika u građi primarne mlečne žlezde kod ženskog i muškog embriona. U starosti embriona od oko dva meseca, mlečna žlezda ponire dublje i počinju da se formiraju sise. Sam proces razvoja sise je nešto sporiji kod embriona muškog pola (Duke, 1993; Akers, 2002). Tokom daljeg embrionalnog i fetalnog razvoja, dolazi do postepenog formiranja sisnog kanala i cisterne, kao i mlečne cisterne od koje se počinju granati kanalići koji se završavaju začecima alveola.

### **2.4.2. Postnatalni razvoj mlečne žlezde**

Period rasta i razvoja mlečne žlezde po rođenju se deli na prepubertetski i postpubertetski period koji se završava sa prvom gestacijom i period promena u vimenu koje se dešavaju tokom graviditeta i laktacije.

#### a. Prepubertetski i postpubertetski razvoj mlečne žlezde

U prvim mesecima po rođenju, mlečna žlezda raste izometrično kao i ostatak tela junice. Alometričan rast mlečne žlezde nastupa u uzrastu junice od oko dva do tri meseca, pri čemu se mlečna žlezda brže razvija u odnosu na ostatak tela životinje (Sinha i Tucker, 1969; Sejršen, 1994; Boboš i Vidić, 2005). Osnovna karakteristika razvoja vimena u ovom periodu je njeno povećanje kao rezultat nagomilavanja masnog tkiva, razvoj kanalikularnog sistema sekretornog dela vimena, kao i postizanje konačnog oblika vimena. Pri pojavi puberteta, mlečna žlezda nastavlja da raste izometrično do pojave prve gestacije (Sinha i Tucker, 1969). U juvenilnom periodu, masno i vezivno tkivo čini čak 85% mlečne žlezde, dok ostatak predstavljaju kanali i kanalske šupljine (Sejršen i sar., 1982).

Pojava estrusa i uspostavljanje ciklične ovarijalne aktivnosti predstavlja jak stimulus za dalji rast i razvoj mlečne žlezde. Pod uticajem polnih hormona (estrogen i progesteron), kao i nekih hormona adenohipofize (somatotropni i luteotropni hormon) i kore nadbubrežne žlezde, zapaža se intenzivan rast i razvoj kanalikularnog sistema parenhima vimena na čijim krajevima se formiraju sekretorne alveole (Hovey i sar., 2002; Tyler i Ensminger, 2006). Na taj način vime dobija svoju konačnu funkcionalnu građu, odnosno postaje tubuloalveolarna žlezda.

#### b. Razvoj mlečne žlezde tokom graviditeta

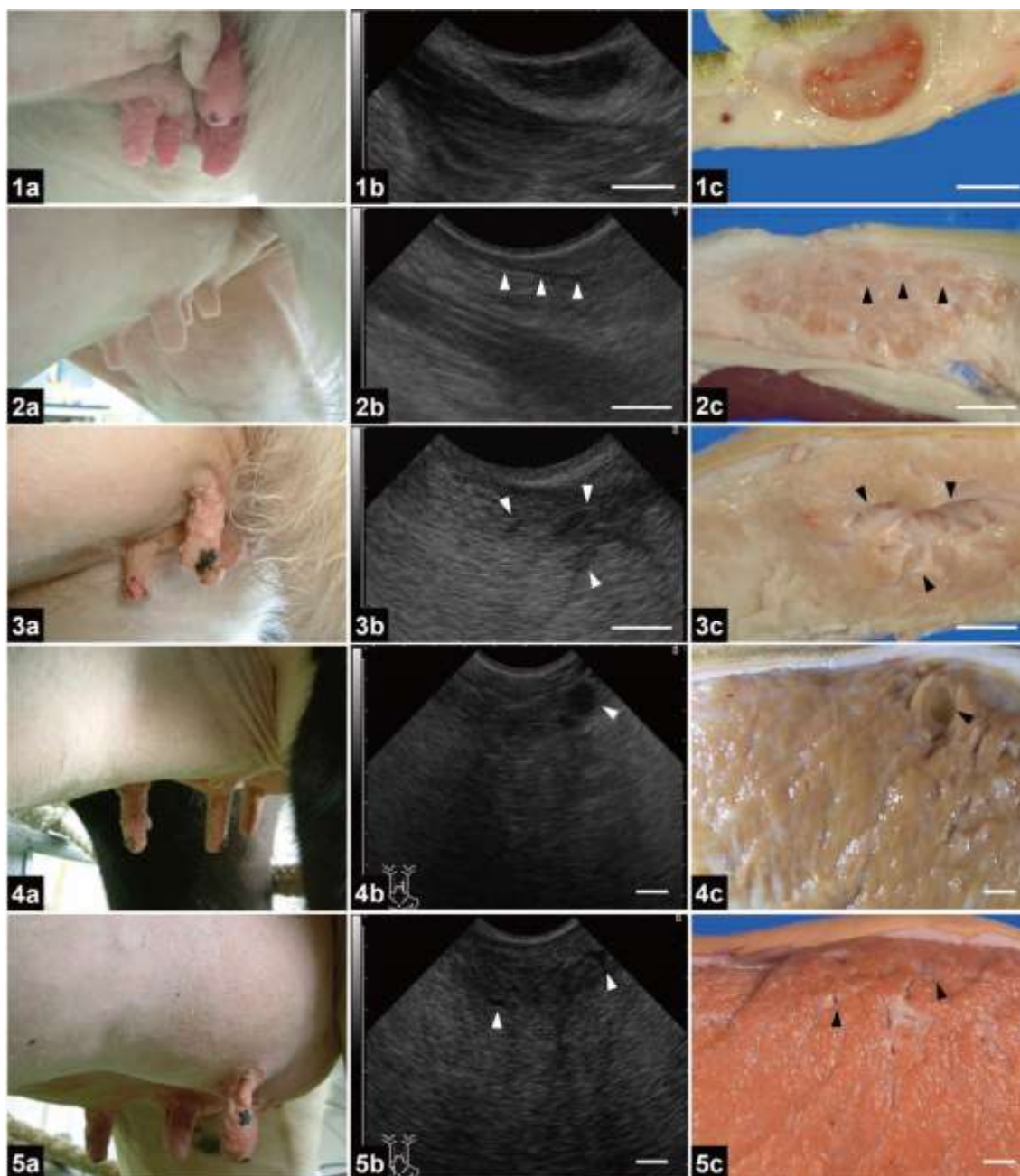
U toku graviditeta, mlečna žlezda se razvija pod delovanjem polnih hormona, a naročito progesterona. Kanalikularni sistem parenhima vimena se ekstenzivno razvija u prvim mesecima gestacije, dok se razvoj alveola zapaža posle petog meseca bremenitosti, pri čemu se u njima formira sekretorni epitel. Istovremeno, zapaža se regresija masnog i vezivnog tkiva vimena (Tucker, 1969). Sekretorni epitel alveola postepeno počinje da funkcioniše tokom zadnje polovine graviditeta. U vezi s tim, alveole postaju proširene jer se u njima nagomilava velika količina proizvoda aktivnosti žlezdanih ćelija alveola. Funkcionalna aktivnost mlečne žlezde otpočinje sa partusom, a prestaje sa završetkom perioda sisanja ili prestankom muže (Boboš i Vidić, 2005).

### c. Razvoj mlečne žlezde tokom laktacije

Pod laktogenezom se podrazumeva početak procesa stvaranja mleka u mlečnoj žlezdi i može se podeliti u dva stadijuma (Neville i sar., 2002). Prvi stadijum se odvija na kraju graviditeta pred sam partus i slabijeg je intenziteta. Mlečna žlezda je dovoljno razvijena da luči male količine određenih komponenti mleka, kao što su kazein i laktoza. Hormonalna regulacija ovog stadijuma još nije sasvim razjašnjena. Drugi stadijum laktogeneze nastaje nakon partusa i predstavlja proces znatno jačeg intenziteta. Posle porođaja, pod uticajem prolaktina, dolazi do maksimalne sekrecije mleka i njegovog oslobađanja u mlečnu cisternu vimena kontrakcijom mioepitelnih ćelija alveola pod uticajem oksitocina. Prvi mlaz sekreta mlečne žlezde nakon partusa, odnosno telenja, naziva se prvi kolostrum koji se prevashodno formira prepartalno, pri čemu se najveći deo stvara 1-3 dana pre partusa i u to vreme on uslovljava značajno povećanje veličine mlečne žlezde.

Promene koje se dešavaju u mlečnoj žlezdi tokom njenog rasta i razvoja se mogu, pored anatomskog i morfološkog pregleda, lako uočiti i ultrazvučnim oslikavanjem.

Rast i razvoj mlečne žlezde u postnatalnom periodu je prikazan na slici 16, gde se ultrazvučno parenhim mlečne žlezde primećuje kao homogena, hiperehogena struktura sa anehogenim područjima koja odgovaraju krvnim sudovima i kanalikularnom sistemu parenhima vimena (Ayadi i sar., 2003; Flock i Winter, 2006; Nishimura i sar., 2010).



**Slika 16.** Anatomski, ultrazvučni i morfološki prikaz mlečne žlezde junica u različitim stadijumima njenog rasta i razvoja (Nishimura i sar., 2010)

1a, 1b i 1c - anatomski, ultrazvučni i morfološki prikaz rasta i razvoja mlečne žlezde kod junica starih dva meseca

2a, 2b i 2c - anatomski ultrazvučni i morfološki prikaz rasta i razvoja mlečne žlezde kod junica starih pet meseca (strelice pokazuju kanalikularni sistem parenhima vimena)

3a, 3b i 3c - anatomske, ultrazvučne i morfološke prikaze rasta i razvoja mlečne žlezde kod junica u postpubertetskom periodu starih 12 - 14 meseca (strelice pokazuju kanalikularni sistem parenhima vimena)

4a, 4b i 4c - anatomske, ultrazvučne i morfološke prikaze rasta i razvoja mlečne žlezde kod gravidnih junica u petom i šestom mesecu gestacije (strelice pokazuju kanalikularni sistem parenhima vimena)

5a, 5b i 5c - anatomske, ultrazvučne i morfološke prikaze rasta i razvoja mlečne žlezde kod gravidnih junica 21 do 24 dana pred partus (strelice pokazuju kanalikularni sistem parenhima vimena)

## 2.5. Imunobiologija mlečne žlezde

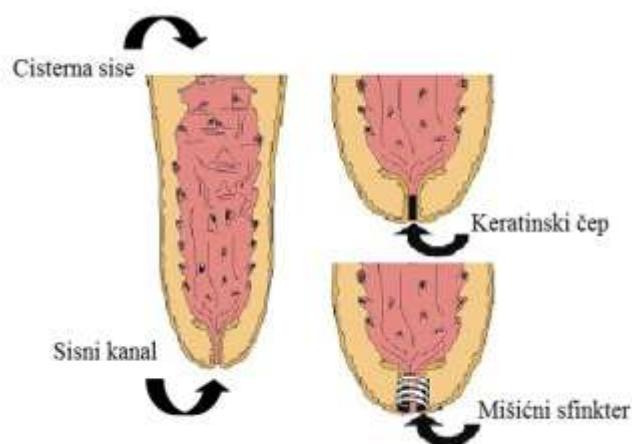
Mlečna žlezda je preko izvodnih kanala u neposrednom kontaktu sa spoljašnjom sredinom tako da postoji velika verovatnoća za nastanak infekcije. Iz tog razloga neophodni su zaštitni mehanizmi odbrane vimena od infekcija koji su podeljeni u dve različite kategorije: nespecifični (urođeni) i specifični (stečeni) imuni mehanizmi (Sordillo i sar., 1997), koji zajedno obezbeđuju njenu optimalnu zaštitu.

Urođeni odbrambeni mehanizmi imaju dominantnu ulogu tokom početne faze infekcije i deluju na mestu infekcije (Rainard i Riollet, 2006). U nespecifične zaštitne mehanizme spadaju, u prvom redu, anatomska odbrana (intaktna koža vimena, struktura i funkcija sisnog kanala), celularna (neutrofilni granulociti, makrofagi, limfociti, NK ćelije) i određeni rastvorljivi faktori (imunoglobulini, laktoferin, lizozim, laktoperoksidaze).

Mikroorganizmi, koji dovode do upalnih procesa u mlečnoj žlezdi, mogu da prodru u nju preko *ductus papillaris*-a i dalje preko cisterne i mlekovoda do alveolarnih šupljina. U funkcionalnom smislu fizičku barijeru vimena čini intaktna koža i sfinkter sise, kao i keratinski čep koji zajedno preveniraju prodor mikroorganizama. Propust u njihovom normalnom funkcionisanju može rezultirati intramamarnom infekcijom. Povrede i oštećenja na koži papile pogoduju kolonizaciji bakterija povećavajući rizik njihovog ulaska u vime i to najčešće u periodu između muže kada je sisni kanal proširen. U zaštiti vimena od infekcije bitnu ulogu imaju oblik i veličina papile, a naročito građa njenog vrha. Vrh svake sise, oko izvodnog kanala, okružen je kružnim

mišićem (*m. sphincter*), čija je osnovna uloga da spreči prodor mikroorganizama i oticanje mleka iz sise, odnosno vimena, putem slobodnog pada (Slika 17).

Zid sisnog kanala je obložen višeslojnim epitelnim ćelijama koje sadrže keratin. Deskvamacijom epitela unutar sisnog kanala stvara se masni talog sličan vosku (laktosebum), koji ima bakteriocidni efekat u sprečavanju širenja mikroorganizama unutar papile i njihovog prodora u mlečnu cisternu i parenhim vimena (Hibbitt i sar., 1969; Boboš i Vidić, 2005). U keratinu postoje antimikrobni agensi, kao i esterifikovane i neesterifikovane masne kiseline kao što su miritinska, palmitoleinska i linoleinska kiselina koje imaju bakteriostatsko dejstvo. Katjonski proteini u sisnom kanalu se elektrostatički vezuju za uzročnike mastitisa oštećujući bakterijski zid i tako ih čine osjetljivim na osmotski pritisak što doprinosi lizi i uništenju bakterijske ćelije (Sordillo i sar., 1997).



**Slika 17.** Fizička barijera sisnog kanala mlečne žlezde (Nickerson i Akers, 2002)

U zavisnosti od funkcionalnog stanja vimena i celog tela, kolostrum i mleko poseduju antibakterijsko dejstvo zahvaljujući ćelijskim i humoralnim odbrambenim faktorima koji se nalaze u njima. Celularnu odbranu čine somatske ćelije (mlečne ćelije ili endogene ćelije mleka) koje potiču iz krvi i tkiva vimena. U mleku zdravog vimena, javljaju se u promenljivoj količini od  $2\text{-}30 \times 10^5/\text{mL}$ , dok u slučaju intramamarnе infekcije uočava se drastično povećanje njihovog broja u kratkom vremenskom periodu ( $20\text{-}50 \times 10^6/\text{mL}$ ). Oscilacija broja somatskih ćelija zapaža se tokom laktacije kod krava i kada nema poremećene sekrecije (Hagnestam-Nielsen i sar., 2009), pri čemu je njihov broj povećan na početku laktacije, a normalne vrednosti se postižu posle treće nedelje

od partusa. U ovu grupu ćelija spadaju neutrofilni granulociti, makrofagi, limfociti i nediferencirane ćelije i ćelijski delovi.

U akutnoj fazi infekcije vimena, neutrofilni granulociti su predominantne ćelije u tkivu i sekretu mlečne žlezde i predstavljaju više od 90% od ukupnih leukocita mlečne žlezde. Ove nespecifične ćelije dospevaju iz krvi u mlečnu žlezdu kao odgovor na inflamatorne medijatore kao što su citokini, komplement i prostaglandini (Persson i sar., 1993). Njihova odbrambena funkcija se ogleda u fagocitozi izazivača infekcije. Bakteriocidni efekat neutrofilni granulociti ispoljavaju preko „respiratornog praska“ uz posredovanje slobodnih radikala.

Makrofagi su najučestalije ćelije u mleku i tkivu vimena u periodu involucije mlečne žlezde, kao i u toku laktacije. Makrofagi su aktivne fagocitne ćelije mlečne žlezde koje su sposobne ingestiji bakterija, ćelijskih ostataka, kao i akumuliranih komponenti mleka (Sordillo i Nickerson, 1988). Njihova aktivnost fagocitoze se može pojačati delovanjem imunoglobulina.

Limfociti u sekretu mlečne žlezde potiču iz krvi i njihova uloga još nije sasvim razjašnjena. Postoje dve populacije limfocita i to: T - limfociti, nosioci ćelijskog imuniteta i B - limfociti, nosioci humoralnog imuniteta. Procenat limfocita u ukupnom broju ćelija mleka iznosi 4-31%, dok u kolostrumu 30-40%, pri čemu oni u malom procentu potiču od B - limfocita, a u većim delom od T - limfocita. T - limfociti imaju ulogu u indukciji i supresiji imunološkog odgovora koji nastaje kao odgovor na određene antigene, kao i u nastanku imunološke memorije, dok B - limfociti u kontaktu sa antigenom se transformišu u plazmocite koji sintetišu imunoglobuline. „*Natural killer*“ (NK) ćelije predstavljaju limfocite treće populacije bez receptore za antigen, ali sa izrazitom citotoksičnom aktivnošću.

U somatske ćelije se ubrajaju i nediferencirane ćelije i ćelijski delovi koji predstavljaju uglavnom izumrle i izmenjene ćelije, kao i produkti raspada ćelija i nemaju značaja kao odbrambeni faktori mleka (Boboš i Vidić, 2005).

Određivanje broja somatskih ćelija mleka može da posluži za rano otkrivanje subkliničkih i akutnih formi mastitisa, gde se uočava njihovo povećanje (Green i sar., 2004; de Haas i sar., 2004).

U odbrani mlečne žlezde od patogena, uključeni su i određeni rastvorljivi faktori koji se dele na urođene i specifične komponente.

Imunoglobulini su visokomolekularne belančevine koje, kao specijalni odbrambeni faktori, uslovljavaju humoralni imuni odgovor organizma. Ove proteine proizvode plazma ćelije koje su nastale proliferacijom i diferencijacijom antigenom aktiviranih B - limfocita. Antitela sekreta mlečne žlezde se sintetišu lokalno u samoj žlezdi, ili potiču iz seruma, odakle prolaze transudacijom ili selektivnim transportom. U odbrani mlečne žlezde od uzročnika mastitisa, učestvuju tri klase imunoglobulina: IgG (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>), IgA i IgM. Sadržaj imunoglobulina u mleku zavisi od stadijuma laktacije i od zdravstvenog statusa mlečne žlezde. Koncentracije antitela su relativno niske u toku laktacije u zdravim mlečnim žlezdama (0,08-0,1 g/mL), pri čemu kolostrum pokazuje visoke ukupne vrednosti imunoglobulina (6-10 g/100 mL) (Sordillo i sar., 1987, Boboš i Vidić, 2005). Visoke koncentracije imunoglobulina u ovom periodu su od izuzetnog značaja za prenos pasivnog imuniteta na tele, dok su od malog značaja za mlečnu žlezdu i njenu zaštitu. Porast koncentracije imunoglobulina se može uočiti i tokom inflamatornih procesa u mlečnoj žlezdi. U sekretu vimena, prevlađuju IgG<sub>1</sub> (81%) koji selektivnim transportom iz krvi dospeva u mleko (Gapper i sar., 2007). Ostale klase imunoglobulina su prisutni u malim koncentracijama u mleku (Tabela 1).

**Tabela 1.** Imunoglobulini u kolostrumu i mleku krava (Butler, 1973)

Imunoglobulini	Koncentracija, mg/mL		% od ukupnih imunoglobulina	
	Kolostrum	Mleko	Kolostrum	Mleko
<b>IgG<sub>1</sub></b>	47,6	0,59	81	73
<b>IgG<sub>2</sub></b>	2,9	0,02	5	2,5
<b>IgA</b>	3,9	0,14	7	18
<b>IgM</b>	4,2	0,05	7	6,5

Načini delovanja imunoglobulina mleka još uvek nisu do kraja rasvetljeni, ali se pretpostavlja da deluju slično kao i imunoglobulini u krvi i tkivima. IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> i IgM mogu da opsonizuju bakteriju što dovodi do olakšane i povećane fagocitoze bakterije od strane neutrofilnih granulocita i makrofaga. Pored toga, ovi imunoglobulini su komplement aktivirajuća antitela. Usled delovanja enzima komplement sistema koji oštećuju membranu, dolazi do lize bakterija. Imunoglobulini klase A doprinose



aglutinaciji, sprečavaju kolonizaciju bakterija i neutrališu toksine (Nickerson i sar., 1989).

Laktoperoksidaza - tiocijanat - vodonik peroksid sistem ispoljava antibakterijsko dejstvo samo kada su u mleku prisutne sve tri komponente ovog sistema u optimalnoj koncentraciji. Enzim laktoperoksidaza, u prisustvu tiocijanata i vodonik peroksida, ispoljava bakteriostatsko dejstvo ka gram-pozitivnim bakterijama i bakteriocidno dejstvo ka gram-negativnim bakterijama. Laktoperoksidaza predstavlja glikoprotein koji sadrži gvožđe i produkuje ga mlečna žlezda u malim koncentracijama, oko 0,03 mg/mL (Kussendrager, 1993). Sadržaj tiocijanata u mleku zavisi prvenstveno od ishrane životinja, a potiče iz krvi. Vodonik peroksid se konstantno stvara u mleku, ali se uglavnom ne može dokazati u njemu jer odmah podleže razlaganju.

Lizozim je bakteriocidni, enzimski, niskomolekularni, globularni protein koji je prisutan u mleku i svoju funkciju ispoljava odvajanjem peptidoglikana iz ćelijskog zida gram-pozitivnih bakterija (Masschalck i Michiels, 2003). Kod gram-negativnih bakterija lizozim je delotvoran tek nakon uklanjanja lipoproteina, odnosno lipopolisaharida, pri čemu je neophodno zajedničko delovanje sa specifičnim antitelima (IgA) i komplemenata. Poreklo lizozima u mleku nije jasno određeno, ali se tkivo mlečne žlezde smatra glavnim izvorom. Koncentracija lizozima u mleku iznosi 0,1-1 mg/L, dok u kolostrumu 6-40 mg/L i njegovo prisustvo oslikava zdravstveno stanje vimena. Niže koncentracije ovog proteina u sekretu mlečne žlezde predstavljaju veću verovatnoću od pojave infekcije vimena (Boboš i Vidić, 2005).

## 2.6. Laktoferin

Laktoferin (poznat kao i laktotransferin) je gvožđe vezujući glikoprotein koji se nalazi u sekretu mlečne žlezde i kojeg produkuju neutrofilni granulociti i epitelne ćelije vimena. Pored mleka i zasušenog sekreta vimena, može se naći i u drugim telesnim tečnostima kao što su bronhijalna, nazalna i cervikalna sluz, urin, žuč, pljuvačka, suza, semena plazma (Mason i sar., 1966). Koncentracija laktoferina u mleku zavisi od stadijuma laktacije, kao i od zdravstvenog statusa mlečne žlezde. U zrelom kravljem mleku sadržaj laktoferina je relativno nizak (0,02-0,35 mg/mL), dok se njegova

koncentracija povećava u toku perioda involucije (20-100 mg/mL) (Welty i sar., 1976). Zapaljenski procesi u vimenu povećavaju sadržaj laktoferina u mleku. Laktoferin ispoljava bakteriostatsko dejstvo vezujući gvožđe i tako ga limitira bakterijama kojima je ovaj element neophodan za rast i bakteriocidnu aktivnost koja rezultira direktnom interakcijom laktoferina i bakterije. Pored antibakterijske funkcije, dokazano je da laktoferin ima i antivirusnu, antifungalnu, antiparazitsku, antiinflamatornu i antikancerogenu aktivnost.

### **2.6.1. Istorijski podaci o laktoferinu**

Laktoferin je prvo bio izolovan iz kravljeg mleka i tek kasnije iz humanog (Johansson, 1958). Prvo saopštenje o laktoferinu datira iz 1939. godine kada su ga iz kravljeg mleka izolovali i opisali kao „crvena proteinska frakcija“ (Sorensen i Sorensen, 1939), dok je prvi put izolovan iz humanog mleka 1951. godine (Shafer, 1951). Crveni protein je tada definisan kao laktotransferinu ili laktosiderofilinu sličan glikoprotein jer je imao velike sličnosti sa serum transferinom i siderofilinom i ovotransferinom iz jaja.. Do 1963. godine se smatralo da je laktoferin specifični protein mleka, kada je izolovan iz sputuma pacijenta sa bronhitisom (Biserte i sar., 1963), a potom imunološkim metodama otkriven i u drugim telesnim sekretima.

Od otkrića i izolacije laktoferina pa do danas, naučnici su proučavali njegovu strukturu, funkciju i potencijalnu primenu, kao i njegovo dejstvo protiv bakterijskih, virusnih i gljivičnih infekcija, tumora i imunosupresornih bolesti.

### **2.6.2. Struktura laktoferina**

Laktoferin (Lf) je glikoprotein sa molekulskom težinom oko 80 kDa koji ima visok afinitet ka vezivanju gvožđa. Molekularna struktura i aminokiselinska sekvenca humanog laktoferina određena je 1984. godine, kada se potvrdilo da je 60% sekvenci laktoferina identično sa serum transferinom i od tada je svrstan u tu grupu (Metz-Boutigue i sar., 1984). Aminokiselinske sekvence laktoferina su poznate kod devet životinjskih vrsta: ljudi, svinja, konja, goveda, bizona, ovaca, koza, kamila i miševa (Baker, 2005). Goveđi laktoferin ima molekulsku masu 83,1 kDa i izgrađen je iz 689 aminokiselinskih ostataka. Humani (hLf) i goveđi laktoferin (bLf) imaju 69% sekvenci homologno i strukturno su veoma slični (Tabela 2) (Pierce i sar., 1991).

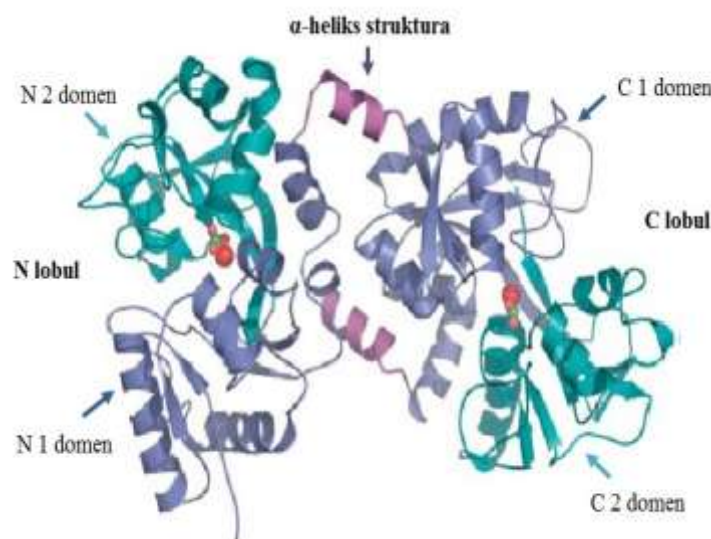
**Tabela 2.** Broj aminokiselinskih ostataka u goveđem i humanom laktoferinu  
(Pierce i sar., 1991)

<b>Aminokiseline</b>	<b>Kravlje mleko</b>	<b>Humano mleko</b>
<b>Alanin</b>	67	63
<b>Prolin</b>	30	35
<b>Arginin</b>	39	43
<b>Lizin</b>	54	46
<b>Asparagin</b>	29	33
<b>Valin</b>	47	48
<b>Triptofan</b>	13	10
<b>Cistein</b>	34	32
<b>Treonin</b>	36	31
<b>Izoleucin</b>	15	16
<b>Serin</b>	45	50
<b>Glutamin</b>	29	27
<b>Glutaminska kiselina</b>	40	42
<b>Fenilalanin</b>	27	30
<b>Metionin</b>	4	5
<b>Leucin</b>	65	58
<b>Glicin</b>	48	54
<b>Tirozin</b>	22	21
<b>Asparaginska kiselina</b>	36	38
<b>Histidin</b>	9	9
<b>Ukupan broj aminokiselinskih ostataka</b>	<b>689</b>	<b>691</b>

Trodimenzionalna struktura laktoferina je otkrivena metodom rendgenske kristalografije (rendgenska strukturalna analiza), pri čemu je uočena velika sličnost između humanog i goveđeg laktoferina (Anderson i sar., 1987).

Laktoferin se sastoji od jednog polipeptidnog lanca savijenog u dva simetrična globularna lobula (režnja), koji su nazvani C (karboksilni) i N (amino) terminali i povezani su sa  $\alpha$ -heliks strukturom koja se nalazi između 334-og i 344-og aminokiselinskog ostatka (hLf). Alfa heliks je trostruko savijeni peptid i predstavlja vezu između lobula koja daje fleksibilnost molekulu (González-Chávez i sar., 2009). N lobul goveđeg laktoferina čine aminokiselinske rezidue 1-333, dok C lobul sačinjavaju

aminokiseline 345-389. Ova dva lobula sadrže 125 identičnih aminokiselinskih ostataka, odnosno 37% su homologni sa sličnom tercijalnom strukturom (Farnaud i Evans, 2003). C i N lobul su načinjeni od  $\alpha$ -heliks i  $\beta$ -nabrane strukture i stvaraju svaki po dva domena poznati kao C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, N<sub>1</sub> i N<sub>2</sub> (Shanbacher i sar., 1993). Ovi domeni stvaraju po jedno mesto za vezivanje jona metala na oba režnja (Slika 18). Laktoferin ima velik afinitet ka vezivanju jona gvožđa, ali pored njega, može da veže sa manjim afinitetom i jone drugih metala, kao što su joni cinka, bakra, mangana itd. Kristalna struktura laktoferina zasićenog Mn<sup>2+</sup> ili Zn<sup>2+</sup> ima zatvorenu konformaciju i dokazano je da održava neke fiziološke funkcije laktoferina nezavisne od funkcije vezivanja jona gvožđa (Berlutti i sar., 2011).



**Slika 18.** Struktura humanog hololaktoferina. Crvenom bojom obeleženi joni gvožđa (Baker i Baker, 2005)

Laktoferin je glikozilovani protein, koji kod različitih vrsta životinja poseduje različit broj i strana za glikozilaciju. Na površini molekula goveđeg laktoferina, nalaze se pet mogućih lokacija za glikozilaciju. Ova mesta se nalaze na N terminalnom domenu i predstavljaju aminokiselinske ostatke Asn233 i Asn281, i na C terminalnom domenu Asn368, Asn476 i Asn545 (Pierce i sar., 1991). Od glikana najčešće su prisutni N-acetilneuraminska kiselina (sijalinska kiselina), galaktoza, manoza, fukoza, N-acetilglukozamin i N-acetilgalaktozamin. Heterogenost glikanskih jedinica laktoferina je više izražena nego kod serum transferina. Step en glikozilacije varira i određuje step en rezistencije laktoferina na proteaze. Biološka funkcija glikana nije jasno razjašnjena.

Pretpostavlja se da glikani učestvuju u pravilnom savijanju i održavanju funkcionalnosti aktivne konformacije molekula laktoferina, kao i u zaštiti od proteolitičkih enzima i smanjenju imunogenosti samog proteina (Shimazaki, 2000; van Veen i sar., 2004).

Laktoferin je bazni, pozitivno naelektrisan protein sa izoelektričnom tačkom (pI) od 8,4 do 9,0. Izrazito bazni karakter je karakterističan za laktoferin i od izuzetnog značaja za njegovu aktivnost vezivanja jona gvožđa, kao i sposobnost za vezivanje različitih ćelijskih struktura i anjonskih makromolekula (Farnaud i Evans, 2003).

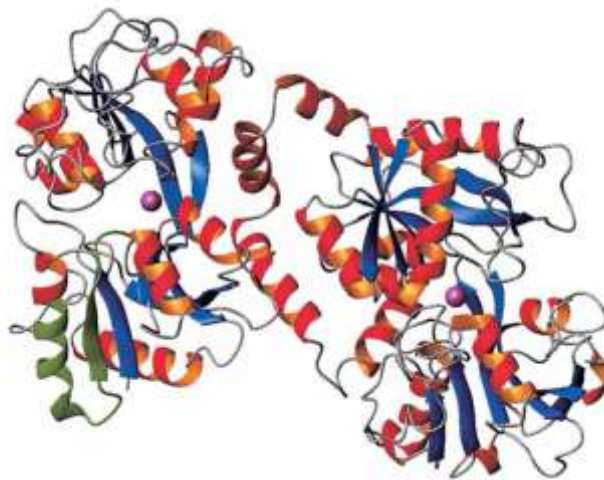
Postoje tri forme laktoferina u zavisnosti od njegove zasićenosti sa jonima gvožđa. Laktoferin reverzibilno vezuje atome metala i tako može da egzistira u sledećim oblicima: apolaktoferin (ne sadrži gvožđe), monoferična forma (vezuje jedan jon gvožđa) i hololaktoferin (vezuje dva jona gvožđa). Tercijalna struktura apolaktoferina i hololaktoferina je različita (Jameson i sar., 1998; Baker i Baker, 2004). Apolaktoferin ima otvorenu konformaciju, dok hololaktoferin je zatvoren molekul, veoma stabilne i čvrste konformacije. Laktoferin bez gvožđa je fleksibilan i podložniji termičkoj denaturaciji i proteolizi. Oba lobula molekula laktoferina (N i C lobuli) imaju, po strukturi i geometriji, identične površine za vezivanje jona gvožđa koje stvaraju četiri proteinska liganda: jedan asparagin, dva tirozina i jedan histidin. Na N lobulu proteina vezu za jon gvožđa čine aminokiseline Asp-60, Tyr-92, Tyr-192 i His-253, dok na C lobulu tu vezu predstavljaju Asp-395, Tyr-433, Tyr-526 i His-595 (Berluti i sar., 2011). Molekul laktoferina može da veže dva jona gvožđa, pri čemu su za to neophodni bikarbonatni joni. U mleku, zasićenost laktoferina jonima gvožđa iznosi 6-8%, što znači da je u njemu veća zastupljenost apo forme laktoferina (Goldsmith i sar., 1982). Afinitet ka vezivanju gvožđa je izrazito visok, i u odnosu na serum transferin, laktoferin vezuje ovaj metal čak 260 puta jače (Aisen i Liebman, 1972). Destabilizacija zatvorene konformacije laktoferina (holo), kao i niske pH vrednosti (pH 3-4), dovode do otpuštanja jona gvožđa (Baker i Baker, 2005).

### **2.6.3. Antimikrobni peptidi laktoferina**

Laktoferin zasićen jonima gvožđa, u odnosu na druge glikoproteine koji vezuju ovaj metal, je otporniji na proteolitičku degradaciju u digestivnom sistemu. U organskim sekretima, veći je procenat zastupljenosti laktoferina u slobodnoj formi

(apolaktoferin) koji je osetljiviji i podložniji proteolizi, pri čemu nastaju antimikrobni peptidi laktoferina. Tomita i sar. (1991) navode da pepsin hidrolizovan laktoferin ima moćniju antimikrobnu aktivnost u odnosu na intaktni laktoferin. Efikasnija antimikrobna aktivnost ovih peptida se može objasniti postojanjem razlike u njihovoj veličini i veličini molekula laktoferina. Peptidi su manji i lakše mogu prići površini bakterija i stupiti u interakciju sa komponentama membrana i ćelijskog zida.

Laktoferin sadrži raznovrsne antimikrobne peptide, što znači da su oni deo polipeptidnog lanca laktoferina koji nastaju njegovom proteolizom od strane različitih proteolitičkih enzima (Sinha i sar., 2013). Antimikrobni peptidi potiču sa N terminalnog lobula molekula laktoferina pri čemu prvih jedanaest aminokiselinskih ostataka čini peptid LF1-11, aminokiseline od 17-41 predstavljaju laktofericin a laktoferampin čine aminokiselinski ostaci 268-284. Sam mehanizam delovanja ovih peptida nije u potpunosti razjašnjen, ali pretpostavlja se da se oni vezuju za proteine spoljašnje membrane bakterija ili za mikrobne proteine. Najznačajniji od svih antimikrobnih peptida laktoferina je laktofericin (Slika 19).

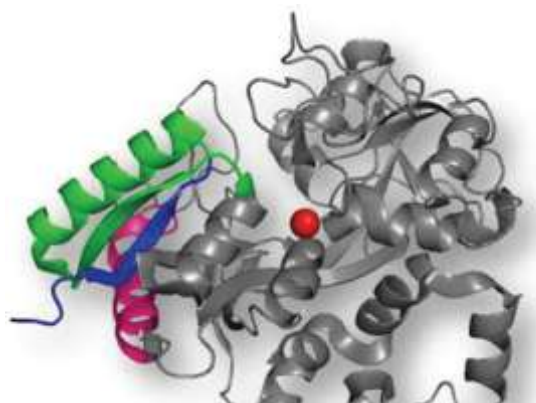


**Slika 19.** Tercijalna struktura bLF sa prikazom laktofericina zelenom bojom,  $\alpha$ -heliks strukture crvenom,  $\beta$ -nabrane strukture plavom i jona gvožđa ljubičastom bojom (Gifford i sar., 2005)

Laktofericin (Lfcin) predstavlja multifunkcionalni peptid nastao proteolizom laktoferina želudačnim pepsinom. Ovaj peptid je heliksne strukture izgrađen od 25 aminokiselinskih ostataka (17-41) sa disulfidnom vezom između dva cisteina i sadrži mnoštvo hidrofobnih i pozitivno naelektrisanih aminokiselina. Bellamy i sar. (1992) su

identifikovali laktofericin i opisali ga kao peptid koji je 10 do 100 puta antibakterijski efikasniji od intaktnog laktoferina, ali bez mogućnosti vezivanja jona gvožđa. Laktofericin ispoljava afinitet ka ćelijskoj membrani i svoj letalni efekat ostvaruje narušavanjem osnovne funkcije membrane. Direktno se vezuje za lipopolisaharide spoljne membrane gram negativnih bakterija, pri čemu dovodi do promena u njenoj propustljivosti (Shimazaki, 2000, van der Kraan i sar., 2004). Gram pozitivne bakterije su osetljivije na laktofericin u odnosu na gram negativne bakterije, pri čemu se laktofericin vezuje za teihoinisku kiselinu ćelijskog zida bakterije. Sam mehanizam prolaska laktofericina kroz sloj ove kiseline, kao i njegov efekat na citoplazmatsku membranu bakterija, nisu dovoljno istraženi. Laktofericin, pored antibakterijske aktivnosti, poseduje antifungicidnu, antivirusnu i antikancerogenu aktivnost, kao i snažna imunološka svojstva (Gifford i sar., 2005).

Pored laktofericina, N<sub>1</sub>-domen laktoferina sadrži i druge antibakterijske peptide-laktoferampin (LFampin) i LF1-11 (Slika 20). Laktoferampin se nalazi na N<sub>1</sub>-domenu laktoferina čineći ga aminokiseline 268-284 (van der Kraan i sar., 2004). Ovaj peptid ima izraženu antibakterijsku i antifungicidnu aktivnost koja se razlikuje od aktivnosti laktofericina, ali je snažnija od intaktnog laktoferina. Laktoferampin ispoljava antimikrobnu aktivnost protiv nekoliko gram pozitivnih i gram negativnih bakterija, od kojih su najznačajnije *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus*. Pored antibakterijskog dejstva ima i antifungicidno dejstvo protiv *Candida* vrste (Sinha i sar., 2013).



**Slika 20.** N terminalni lobul laktoferina sa prikazom antimikrobnih peptida.

Laktofericin prikazan zelenom bojom, laktoferampin sa ružičastom i LF1-11 plavom bojom (Sinha i sar., 2013)

LF1-11 je N terminalni peptid laktoferina i obuhvata prvih jedanaest aminokiselinskih ostataka molekula. Efikasan je protiv više sojeva *Acinetobacter baumannii*, meticilin-rezistentnog *Staphylococcus aureus* i različitih vrsta *Candida* (Sinha i sar., 2013).

#### **2.6.4. Sinteza i eliminacija laktoferina iz organizma**

Pod uticajem hormona, žlezdane epitelne ćelije sintetišu laktoferin, najčešće u apo formi. Pored mleka, laktoferin se u određenim koncentracijama može naći i u pljuvački, suzama, žuči, nazalnom, bronhijalnom, cervikalnom sekretu itd. Pored epitelnih ćelija, laktoferin se sintetiše i tokom diferencijacije promijelocita u mijelocite i predstavlja glavnu komponentu sekundarnih granula polimorfonuklearnih leukocita, odnosno neutrofilnih granulocita (Masson i sar., 1969). Tokom povreda, infekcija ili inflamacija, oslobađa se laktoferin iz sekundarnih granula neutrofila u krv (Baker i Baker, 2005; Artym, 2010, Garcia-Montoya i sar., 2011).

Istraživanja Levay i Viljoen (1995) su ukazala da se laktoferin može eliminisati iz organizma na dva moguća načina. Fagocitne ćelije (makrofagi, monociti) preko receptor posredovane endocitoze uklanjaju laktoferin, i direktno od strane jetre, gde u odstranjivanju laktoferina iz cirkulacije učestvuju Kupfer ćelije, endotelne ćelije i hepatociti. Istraživanjima na pacovima dokazano je da se oko 95% laktoferina aplikovanog intravenski eliminiše od strane jetre u roku od pet minuta (Ziere i sar., 1992). Istraživanja Kutila i sar. (2002) ukazala su da poluvreme eliminacije intramamarno aplikovanog laktoferina iznosi 1,2-4,3 časova. Pored ovih puteva eliminacije laktoferina iz organizma, Hutchens i sar. (1991) su ukazali da su i bubrezi uključeni u odstranjivanju laktoferina iz cirkulacije što su potvrdili njegovim nalazom u urinu novorođenčadi.

#### **2.6.5. Biološka funkcija laktoferina**

Laktoferin predstavlja jednu od ključnih komponenti nespecifične odbrane mlečne žlezde i organizma od infekcija, pri čemu sigergično deluje sa drugim antimikrobnim proteinima mleka, kao što su imunoglobulini G klase i lizozim. Slično svim proteinima iz grupe transferina, laktoferin, zahvaljujući strukturnim karakteristikama učestvuje u održavanju homeostaze jona gvožđa u organizmu. Pored



toga, učestvuje u regulaciji ćelijskog rasta i diferencijacije, a poseduje i snažnu antimikrobnu aktivnost protiv mnogobrojnih bakterija, virusa, gljivica, parazita, kao i antiinflamatornu i antikancerogenu aktivnost (Ward i sar., 2005; González-Chávez i sar., 2009).

#### **2.6.5.1. Antibakterijska aktivnost laktoferina**

Antibakterijska aktivnost laktoferina je istražena i u *in vitro* i *in vivo* uslovima protiv gram pozitivnih i gram negativnih bakterija (*Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *E. coli*). Laktoferin ispoljava i bakteriostatsko i bakteriocidno deljstvo, ali isto tako, laktoferin može da pospeši rast bakterijskih vrsta kao što su *Lactobacillus* i *Bifidobacteria* (Roşeanu i sar., 2010). Prvobitno se pretpostavljalo da laktoferin ispoljava svoju aktivnost jedino preko njegove mogućnosti vezivanja i transporta jona gvožđa, slično kao i serum transferin, sa time da laktoferin zadržava jone metala i u uslovima niske pH vrednosti (El-Loly i Mahfouz, 2011).

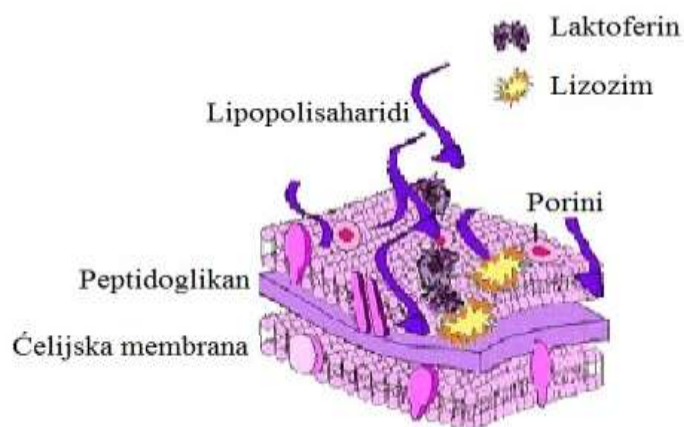
Gvožđe je jedan od osnovnih i neophodnih elemenata za rast i metabolizam skoro svih bakterija (Gherayil, 2011; Cassat i Skaar, 2013). Bakterije su često izložene uslovima niske koncentracije gvožđa unutar tela zbog prisustva gvožđe vezujućih proteina, kao što su laktoferin i serum transferin. Bakteriostatsku funkciju laktoferin ostvaruje vezivanjem jona gvožđa, limitirajući njegovo korišćenje od strane bakterija posledično dovodeći do inhibicije rasta (Arnold i sar., 1980). Ovu aktivnost mogu ispoljiti samo delimično zasićena i apo-forma laktoferina, pošto laktoferin koji je potpuno zasićen gvožđem nema antimikrobnu aktivnost (Bishop i sar., 1976; Arnold i sar., 1982). Bakteriostatski efekat laktoferina je često samo privremen, pošto su se neke gram-negativne bakterije prilagodile gvožđe limitirajućim uslovima produkcijom gvožđe helatora koji može preuzeti ovaj metal od laktoferina (Conneely, 2001).

Bakteriocidna aktivnost se pripisuje direktnom interakcijom proteina sa površinom bakterija. Laktoferin dovodi do oštećenja spoljne membrane gram negativnih bakterija vezujući se za lipopolisaharide ćelijskog zida bakterija (Ellison i sar., 1988) (Slika 21). Pozitivno naelektrisan N-terminalni kraj laktoferina sprečava vezivanje lipopolisaharida i bakterijskih katjona ( $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ ), dovodeći do otpuštanja lipopolisaharida iz ćelijskog zida, povećavajući propustljivost membrane i oštećenja

bakterije (Shimazaki, 2000, van der Kraan i sar., 2004). Otpuštanje lipopolisaharida iz ćelijske membrane može biti sprečeno dodavanjem jona kalcijuma i magnezijuma, koji smanjuju antibakterijsku aktivnost laktoferina (Coughlin i sar., 1983). Prisustvo jona kalcijuma inhibira mogućnost laktoferina da poveća osetljivost *E. coli* na antibiotik rifampicin (Ellison i sar., 1990). Bortner i sar. (1989) su ukazali na značaj ovih dvovalentnih katjona kao modulatora antibakterijske aktivnosti laktoferina. Laktoferin osetljivi sojevi bakterije *Legionella pneumophila* su bili zaštićeni od bakteriocidne aktivnosti proteina dodavanjem kalcijum hlorida, magnezijum nitrata i magnezijum hlorida.

Mnoge gram negativne bakterije, kao npr. *E. coli*, poseduju površinske receptore, proteine, porine koji omogućavaju propustljivost njihove membrane. Laktoferin prepoznaje porine i reverzibilno se vezuje za njih (Erdei i sar., 1994). Porini se mogu zaštititi polisaharidnim delom lipopolisaharida što dovodi do smanjenja antibakterijske aktivnosti molekula laktoferina (Naidu i sar., 1993).

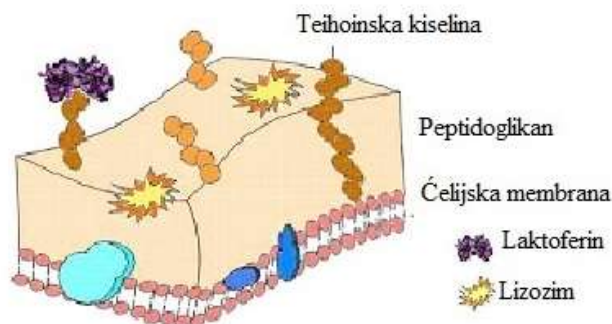
Laktoferin sam najčešće deluje bakteriostatski, ali sa drugim antimikrobnim proteinima kao što su lizozim i antitela deluju sinergično i bakteriocidno. Kompleks IgA i laktoferin ima izraženu bakteriocidnu aktivnost protiv gram pozitivnih i gram negativnih bakterija.



**Slika 21.** Mehanizam antibakterijske aktivnosti laktoferina kod gram negativnih bakterija (González-Chávez i sar., 2009)

Mehanizam aktivnosti laktoferina protiv gram pozitivnih bakterija (Slika 22) se zasniva na vezivanju za anjonske molekule koji se nalaze na njihovoj površini, kao što

je teihoinska kiselina, što dovodi do redukcije negativnog naboja ćelijskog zida čime se olakšava kontakt antimikrobnog proteina lizozima i peptidoglikana koji se nalazi ispod (González-Chávez i sar., 2009).



**Slika 22.** Mehanizam antibakterijske aktivnosti laktoferina kod gram pozitivnih bakterija (González-Chávez i sar., 2009)

Za nastanak hroničnih infekcija je od izuzetnog značaja sposobnost adhezije bakterija na biotičke i abiotičke površine i funkcionisanje kao zajednice, odnosno stvaranje biofilma. Zahvaljujući sposobnosti formiranja biofilma, bakterije stiču visoku otpornost na različite mehanizme odbrane domaćina, kao i na antibiotski tretman. Goveđi laktoferin, u malim koncentracijama, ima sposobnost da inhibira rast i razvoj ove tvorevine, kao i da dovede do njene destrukcije (Jenssen i Hancock, 2009; Hiroyuki i sar., 2012). Laktoferin vezujući jone gvožđa, smanjuje količinu dostupnog metala neophodnog za formiranje biofilma (Roşeanu i sar., 2010; Elsayy i sar., 2013).

Visoko virulentne bakterije su razvile mehanizam da prevaziđu uslove nedostatka jona gvožđa sintezom i sekrecijom helatora (siderofora) koji ispoljavaju visok afinitet ka jonima gvožđa. Gvožđe helatori su i u mogućnosti da otklone ovaj metal iz transferina (Bullen i sar., 2005). Siderofore sintetišu mnogi mikroorganizmi koji rastu pod uslovima smanjene koncentracije gvožđa. Oni vezuju jone gvožđa gradeći kompleks koji se potpuno vezuje za receptore na spoljnoj membrani bakterija i prenose im metal (Neilands, 1995). *E. coli* proizvodi gvožđe helatore enterobaktrin i aerobaktrin (Bullen i sar., 2005), a sadrži i receptore za gvožđe na spoljnoj membrani - gvožđe

enterobaktin proteinski receptor (*ferric enterobactin protein receptor*; FepA) i gvožđe citrat proteinski receptor (*ferric citrate protein receptor*; FecA) (Lin i sar., 1999).

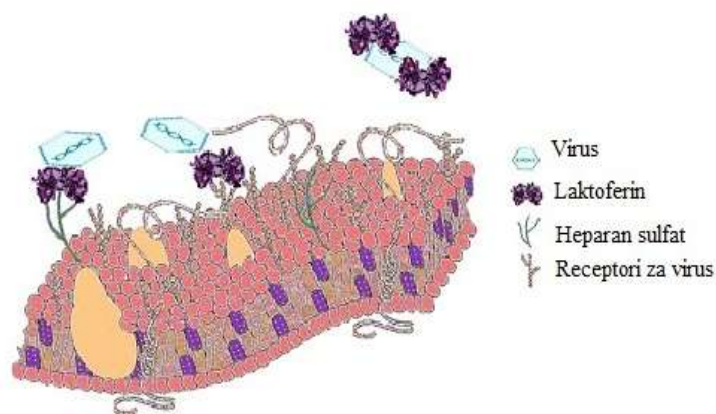
Drugi mehanizam preko kojeg bakterije nabavljaju gvožđe je direktno oduzimanje ovog metala od transferina i laktoferina vezujući ih za specifične receptore koji se nalaze na njihovoj površini. Bakterije iz familije *Neisseriaceae* i *Moraxellaceae* poseduju dva receptora za laktoferin: laktoferin vezujući protein A (*lactoferrin-binding protein A*; LbpA) i laktoferin vezujući protein B (*lactoferrin-binding protein B*; LbpB) (Wong i Schryvers, 2003; Beddek i Schryvers, 2010). LbpA je strukturni protein spoljne membrane koji pospešuje rast bakterija koristeći laktoferin kao izvor jona gvožđa, dok LbpB olakšava ovaj proces. Interakcija laktoferina sa receptorom dovodi do promena u konformaciji C labula proteina dovodeći do otpuštanja jona gvožđa (Roşeanu i sar. 2010).

#### **2.6.5.2. Antivirusna aktivnost laktoferina**

Laktoferin poseduje antivirusnu aktivnost u ranoj fazi infekcije protiv brojnih RNK i DNK virusa, pri čemu sam mehanizam njegove aktivnosti nije u potpunosti razjašnjen. Antivirusna aktivnost laktoferina je nezavisna od njegove sposobnosti vezivanja i transporta jona gvožđa, pošto i hololaktoferin i apolaktoferin ispoljavaju antivirusni efekat, dok antimikrobni peptid laktofericin ne poseduje osobinu inhibicije virusa (El-Loly i Mahfouz, 2011). Ipak, na neke viruse (polio i rota virus), apoforna laktoferina deluje snažnije od zasićenog oblika laktoferina, jer vezivanje laktoferina za ćeliju domaćina dovodi do povećanog preuzimanja jona matala, kao što je  $Zn^{2+}$ , koji deluju antivirusno (Esposito i Obljeski, 1976). Antivirusni efekat jona cinka se ogleda u povećanoj sposobnosti da dovede do nepravilne replikacije virusa. Istraživanja Marchetti i sar. (1999) su pokazala da zasićeni laktoferin sa jonima gvožđa, cinka i mangana poseduje snažni inhibitorski efekat protiv poliovirusa sprečavajući njegovu adheziju na ćeliju domaćina. Drugi mogući razlog za pojačanu antivirusnu aktivnost slobodnog laktoferina je da virusni enzimi zahtevaju jone metala kao kofaktore za svoje funkcionisanje. Laktoferin sprečava ulazak virusa u ćeliju domaćina blokirajući ćelijske receptore ili direktno vezujući se za samu česticu virusa (Slika 23) (van der Strate i sar., 2001).

Laktoferin je u mogućnosti da speči replikaciju mnogih virusa, pri čemu ređe onemogućava infekciju ćelija domaćina. Infekciju ciljne ćelije laktoferin prevenira direktnim vezivanjem za virusnu česticu (*Hepatitis C virus*, polio i rotavirus, *Herpes simplex virus*) (Ikeda i sar., 2000), pri čemu sprečava hemaglutinaciju i vezivanja virusa za ćeliju domaćina.

Drugi mehanizam antivirusne aktivnosti laktoferina je njegovo vezivanje za molekule ćelija domaćina koje virus koristi kao receptore (heparan sulfat proteoglikani). Interakcija laktoferina sa ovim receptorima sprečava prvi kontakt između virusa i ćelije domaćina i nastanak infekcije (van der Strate i sar., 2001; Farnaud i Evans, 2003; González-Chávez i sar., 2009).



**Slika 23.** Mehanizam antivirusne aktivnosti laktoferina (González-Chávez i sar., 2009)

Indirektna antivirusna aktivnost laktoferina se ogleda u podsticanju antivirusnog odgovora imunog sistema organizma, pri čemu dolazi do pojačane stimulacije i aktivnosti NK (*natural killer*) ćelija, granulocita, monocita i makrofaga koji imaju značajnu ulogu u eliminaciji infekcije tokom rane faze virusne infekcije (van der Strate i sar., 2001; Farnaud i Evans, 2003).

### 2.6.5.3. Antifungalna aktivnost laktoferina

Kravlje mleko sadrži nekoliko supstanci koji ispoljavaju antifungalno dejstvo. Slobodne masne kiseline, kao što su laurinska, miristoleinska, linoleinska i arahidonska kiselina, sprečavaju germinaciju *Candida albicans*, pri čemu i laktoferin, preko svog kapaciteta vezivanja jona gvožđa, ispoljava antifungalnu aktivnost (Leboffe i sar., 2009).

Kirkpatrick i sar. su 1971. god. prvi put sprovedli istraživanje o uticaju laktoferina na *Candida* spp. i dokazali njegovo antimikotično dejstvo. Jedan od mehanizama delovanja laktoferina na gljivice jeste njegova sposobnost vezivanja jona gvožđa koji je neophodan za njihov rast i razvoj gljivica. Istraživanja su dokazala da ovo nije jedini mehanizam antifungalne aktivnosti laktoferina. Laktoferin poseduje i fungicidno dejstvo direktnom interakcijom sa površinskim proteinima ćelija gljivica dovodeći do destabilizacije ćelijske membrane, menjajući njenu propustljivost i uzrokujući smrt (González-Chávez i sar., 2009; Leboffe i sar., 2009). Pored *Candida albicans*, antifungalno dejstvo laktoferina je dokazano i protiv: *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *Rhodotorula rubra*, *Rhizopus arrhizus*, kao i kod drugih gljivica. Antimikrobni peptidi laktoferina, kao što je laktofericin i laktoferampin, isto ispoljavaju antifungalno dejstvo. Bellamy i sar. (1993) su prvi procenili da je *Candida albicans* visoko osetljiva na laktofericin B.

Kao i neke bakterije, gljivice, kao npr. *Aspergillus fumigatus*, su razvile mehanizam opstanka u sredinama siromašnim gvožđem sintezom i sekrecijom siderofora koji omogućavaju gljivici korišćenje jona metala vezanih za serum transferin i laktoferin (Leboffe i sar., 2009).

Laktoferin i njegovi peptidi stimulišu imuni odgovor organizma i sinergično deluju u njegovoj odbrani. Antigljivična aktivnost laktoferina je izraženija u saradnji sa polimorfonuklearnim leukocitima gde mnogo efikasnije inhibišu rast i invaziju uzročnika.

#### **2.6.5.4. Antiparazitska aktivnost laktoferina**

Uloga laktoferina, kao i njegov značaj, tokom parazitskih bolesti je nedovoljno poznata, ali dokazana je njegova antiparazitska aktivnost, kao i različiti mehanizmi aktivnosti. Tanaka i sar. (1996) su prvi ukazali na antiparazitsku aktivnost laktoferina protiv protozoa *Toxoplasma*. Laktoferin ispoljava inhibitornu aktivnost intracelularnog rasta parazita, pri čemu dovodi i do povećanja nivo IFN- $\gamma$  i IL-12, kao i aktivnosti makrofaga. Laktoferin nema uticaja na penetraciju parazita u ćeliju domaćina, kao što i ne ispoljava citotoksični efekat (Dzitko i sar., 2007). *Plasmodium* spp. poseduje protein koji prepoznaje i vezuje se za heparan sulfat receptore na površini ćelije domaćina.

Laktoferin svoju antiparazitsku aktivnost kod ovog parazita ostvaruje vezivanjem za ove receptore čineći ih nedostupnim parazitima (Jenssen i Hancock, 2009). Snažan antiparazitski efekat protiv *Entamoeba histolytica* poseduju apolaktoferin i laktofericin. Oni se vezuju za lipide na površini trofozoita oštećujući njegovu membranu sinergično delujući sa IgA i lizozimom (León-Sicairos i sar., 2006). Laktoferin u fiziološkim koncentracijama može da dovede do smrti trofozoita *Giardia lamblia*-e, pri čemu  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  mogu sprečiti antiparazitsku aktivnost laktoferina.  $\text{Fe}^{3+}$ , ali ne i  $\text{Fe}^{2+}$ , štiti trofozoit od laktoferina i njegovih antimikrobnih peptida (Turchany i sar., 1995).

Kao i svi mikroorganizmi, protozoe su razvile efikasan mehanizam korišćenja gvožđa koji je neophodan za njihov rast, tako da prisustvo laktoferina ne može dovesti do supresije ovog procesa. Parazit *Trypanosoma cruzi* je razvio mehanizam opstanka u krvi domaćina zahvaljujući sposobnosti direktnog korišćenja serum helatora domaćina kako bi obezbedio neophodne količine jona gvožđa za rast (Loo i Lalonde, 1984). Drugi paraziti npr. *Leishmania* spp. preživljavaju intracelularno preuzimanjem i iskorišćavanjem holotransferina i hololaktoferina, kao izvor jona gvožđa. Protozoa *Trypanosoma brucei* poseduje na svojoj površini proteine za vezivanje transferina (*transferrin-binding protein*; TFBP), pri čemu, kad nastane kompleks receptor-transferin, transportuje se do lizozima i transferin podleže proteolizi koja rezultira oslobađanjem jona gvožđa (Steverding i sar., 1995).

#### **2.6.5.5. Antiinflamatorna aktivnost laktoferina**

Laktoferin ima značajnu ulogu u regulisanju imuniteta domaćina. Laktoferin se nalazi u sekundarnim granulocitima neutrofila i poseduje i pozitivni i negativni uticaj na mijelopoezu. Sistemska bakterijska infekcija je praćena rapidnim porastom nivoa laktoferina u serumu što posledično dovodi do pada nivoa gvožđa (hipoferemija). Zaštitni efekat laktoferina se ogleda u njegovoj mogućnosti da inhibira produkciju nekoliko lipopolisarahid indukovanih proinflamatornih citokina, uključujući tumor nekrotični faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) i interleukin-6 (IL-6) koji su ključni medijatori inflamatornog odgovora (Crouch i sar., 1992; Conneely, 2001). Pretpostavka je da laktoferin sprečava oslobađanje TNF- $\alpha$  zahvaljujući svojoj sposobnosti vezivanja za lipid A komponentu lipopolisaharida bakterija pri čemu deluje kao antiendotoksin. Antiinflamatorna aktivnost laktoferina se ogleda i u sprečavanju vezivanja

lipopolisaharida za inflamatorne ćelije, kao što su makrofagi. Pored toga, na ćelijskom nivou, laktoferin utiče na povećanje aktivnosti NK ćelija, regrutovanje polimorfonuklearnih leukocita u tkivo zahvaćeno zapaljenskom reakcijom i indukuje fagocitozu (González-Chávez i sar., 2009; Florian i sar., 2012). Sadržaj gvožđa u laktoferinu ne utiče na njegovu antiinflamatornu aktivnost, pošto i apo i holo forma ovog proteina podjednako inhibira oslobađanje citokina.

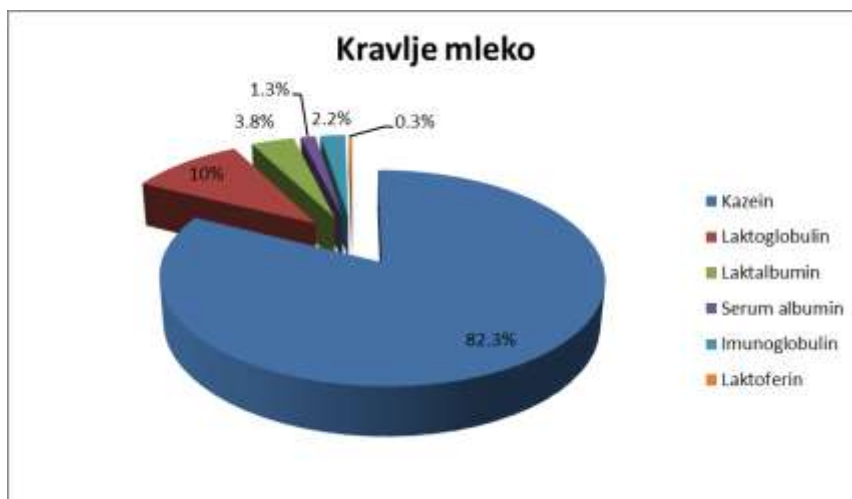
#### **2.6.5.6. Antikancerogena aktivnost laktoferina**

Kao i kod inflamacije, laktoferin ima sposobnost da utiče na produkciju citotokina kod tumora. Istraživanja na miševima su ukazala da aplikacija laktoferina inhibira rast tumora za 60% i povećava nivo antikancerogenih citokina kao što je interleukin-18 (IL-18), pored aktiviranja NK ćelija, CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T-limfocita (Wang i sar., 2000). Florian i sar. (2012) su ispitali efekat apo forme rekombinantnog humanog laktoferina na rast i morfologiju melanoma kod miševa, pri čemu su ukazali da pod uticajem laktoferina nastaju drastične morfološke promene ćelija, kao i inhibicija ćelijske proliferacije.

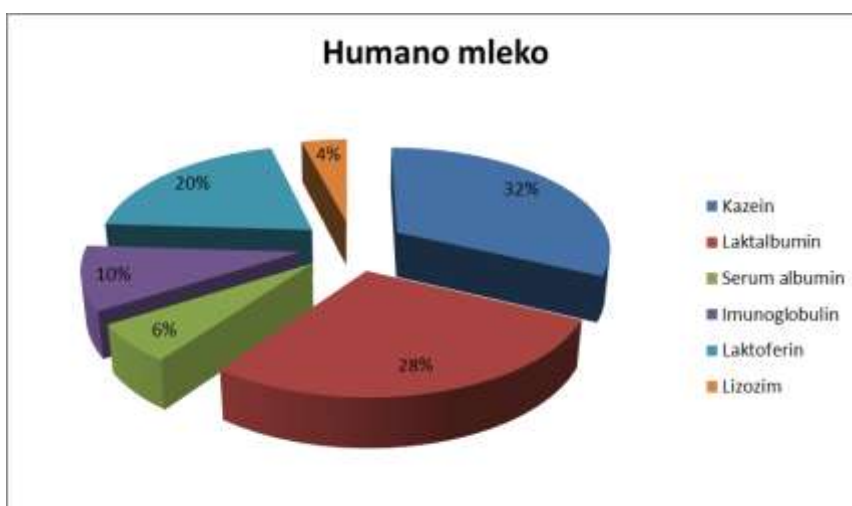
#### **2.6.6. Koncentracija laktoferina u mleku i drugim sekretima**

Kravlje mleko sadrži oko 30-35 g/L belančevina, koje se dele na kazein, koji čini oko 80% od ukupnih proteina, i belančevine mlečnog seruma (20%). Laktoferin u mleku pripada proteinima mlečnog serumu, pri čemu 70% laktoferina se nalazi u serumu, a 30% se javlja u kompleksu sa kazeinom (Oram i Reiter, 1968). U kravljem mleku od proteina mlečnog seruma se mogu izdvojiti:  $\alpha$ -laktalbumin (3,8%) i  $\beta$ -laktoglobulin (10%), imunoglobulini (2,2%), serum albumini (1,3%), kao i bioaktivni proteini koje čine laktoferin, laktoperoksidaza i lizozim (Slika 24) (Shimazaki, 2000). U humanom mleku, laktoferin je drugi po zastupljenosti od proteina, odmah posle kazeina kao što je prikazano na slici 25. Laktoferin se ubraja u urođene odbrambene mehanizme i pored zaštite mlečne žlezde od intramamarnih infekcija, njegova funkcija je i da zaštiti novorođenu jedinku dok ne stekne imunitet.





**Slika 24.** Sadržaj proteina u kravljem mleku (Shimazaki, 2000)



**Slika 25.** Sadržaj proteina u humanom mleku (Shimazaki, 2000)

Glavni izvor laktoferina u organizmu je mleko kojeg sintetišu epitelne ćelije mlečne žlezde u svim fazama laktacije, uključujući i period zasušenja. Laktoferin je prisutan u mleku mnogih sisara uključujući humano mleko, mleko krmača, kobilu, krava, ovaca, koza, miševa, kamila, lama itd (Stumpf i Welch, 2004; Baker, 2005; Conesa i sar., 2008). Nedavno je dokazano da i ribe proizvode laktoferin i izolovan je iz ikri kalifornijske pastrmke (Torres i sar., 2006; González-Chávez i sar., 2009). Humano mleko je veoma bogato laktoferinom (1-2 mg/mL) u odnosu na druge vrste sisara i od svih proteina mleka, laktoferin je drugi po zastupljenosti. Kravlje mleko sadrži skoro deset puta niže koncentracije laktoferina u odnosu na humano mleko (0,02-0,35

mg/mL), dok je njegov sadržaj izuzetno nizak kod pacova, miševa i pasa i iznosi manje od 0,05 mg/mL (Masson i Heremans, 1971; Welty i sar., 1976).

Pored laktoferina, mleko krava sadrži još jedan protein koji poseduje antibakterijsko svojstvo - serum transferin (Rainard i sar., 1982). Istraživanja su pokazala obrnutu zavisnost sadržaja laktoferina i transferina u mleku. Životinjske vrste sa visokom koncentracijom laktoferina u mleku imaju malu koncentraciju ili uopšte nemaju transferin, i obrnuto. Koncentracija transferina u humanom mleku je ispod 0,05 mg/mL, a u kravljem mleku iznosi 0,02-0,2 mg/mL (Bullern i sar., 1972; Shimazaki, 2000). Mleko pacova i zečeva je bogato transferinom, ali mleko pasa je praktično lišeno svih gvožđe vezujućih glikoproteina (Masson i Heremans, 1971).

Kolostrum je bogatiji sa laktoferinom od zrelog mleka, pri čemu njegova koncentracija u humanom kolostralnom mleku iznosi 5-7 mg/mL, a u kravljem oko 0,8 mg/mL. Drastično povećanje koncentracije laktoferina u mleku se zapaža u periodu involucije mlečne žlezde (Masson i Heremans, 1971; Sanchez i sar., 1988).

Tele se rađa bez imuniteta i kolostrum predstavlja izvor različitih biološki aktivnih molekula sa kojima se prenosi pasivni imunitet i štiti ih od infekcija tokom prvih nedelja života. Imunoglobulini zajedno sa laktoferinom, lizozimom i laktoperoksidazom ispoljavaju antimikrobnu aktivnost (Gapper i sar., 2007; Stelwagen i sar., 2009).

U malim koncentracijama, laktoferin se može detektovati i u drugim telesnim sekretima što je prikazano u tabeli 3. Laktoferin je prisutan i u krvnoj plazmi u koncentraciji 0,1-0,2 µg/mL pošto ga proizvode neutrofilni granulociti. Kod sepse, nivo laktoferina se povećava i do 1-2,5 µg/mL (Malmquist i sar., 1978; Nuijens i sar., 1992).

**Tabela 3.** Koncentracija laktoferina u telesnim sekretima čoveka

Sekret	Koncentracija laktoferina	Referenca
Pljuvačka	0,01-0,05 mg/mL	Masson i sar. (1966)
Suze	0,1 mg/mL	Masson i sar. (1966)
	0,7 mg/mL	Takayanagi i sar. (1986)
	2,2 mg/mL	Kijlstra i sar. (1983)
Semena plazma	0,4-1,9 mg/mL	Steijns i van Hooijdonk (2000)
Nazalni sekret	0,1 mg/mL	Masson i sar. (1966)
Žuč	10-40 µg/mL	Masson i sar. (1966)
Pankreasni sekret	0,5 mg/mL	Masson i sar. (1966)
mokraća	1 µg/mL	Masson i sar. (1966)
Krv	0,1-2,5 µg/mL	Malmquist i sar. (1978)
Neutrofili	3,45 µg/10 <sup>6</sup> ćelija	Moguilevsky i sar. (1987)
Granulociti	4 µg/10 <sup>6</sup> ćelija	Bezwoda i Mansoor (1989)

### 2.6.7. Faktori koji utiču na koncentraciju laktoferina u sekretu zdrave mlečne žlezde

#### 2.6.7.1. Stadijum laktacije, starost i rasa životinje kao faktori koji utiču na koncentraciju laktoferina u mleku krava

Nivo laktoferina u sekretu mlečne žlezde krava zavisi prvenstveno od stadijuma razvoja vimena i njene funkcije, odnosno od stadijuma laktacije, koji je jedan od glavnih fizioloških faktora koji utiče na produktivnost i hemijski sastav mleka.

Posle partusa, koncentracija laktoferina se snižava sa 1-2 mg/mL u mleku na 0,01-0,1 mg/mL u kolostrumu, pri čemu se u toj koncentraciji nalazi i tokom laktacije. U periodu involucije mlečne žlezde, zapaža se drastičan rast koncentracije laktoferina gde dostiže maksimalne vrednosti oko 20 mg/mL, iako su zabeležene i mnogo veće vrednosti (75-100 mg/mL) (Welty i sar., 1976; Schanbacher i sar., 1993). Ovo povećanje koncentracije laktoferina počinje dva do četiri dana posle prestanka muže i nastavlja da raste po stopi 1,15 mg/mL po danu tokom prve dve - tri nedelje involucije (Welty i sar., 1976). Laktoferin u sekretu mlečne žlezde krava dostiže maksimalnu koncentraciju mesec dana posle zasušenja. Tokom nelaktacionog perioda koncentracija laktoferina ostaje visoka (Sordillo i sar., 1987). Potpuno zasušeno vime je veoma

otporno na koliformne infekcije uglavnom zbog visoke koncentracije laktoferina u ovom periodu (Oliver i Bushe, 1987).

Rasa životinje, odnosno krave, značajno utiče na nivo laktoferina u kolostrumu, iako postoje individualne razlike koje su izraženije u visokomlečnih krava. Koncentracija laktoferina u kolostrumu visokomlečnih krava je četiri puta veća u odnosu na tovnne rase goveda i iznosi 2 mg/mL, dok je kod tovnih rasa 0,5 mg/mL (Gaunt i sar., 1980; Tsuji i sar., 1990). Istraživanja Tsuji i sar. (1990) ukazuju da je koncentracija laktoferina bila najveća u mleku krava rase holštajn frizijska (1,96 mg/mL) i džerzej (2,11 mg/mL), dok mleko krava rase japanska crna i japanska smeđa sadrži znatno nižu koncentraciju (0,56 mg/mL i 0,40 mg/mL). Król i sar. (2010, 2012) u svom istraživanju, navode da su krave rase poljska crvena i simental imale najveći nivo laktoferina u mleku (128,70 mg/L i 116,74 mg /L), u odnosu na krave rase poljska holštajn frizijska crno bela (88,42 mg/L) i poljska holštajn frizijska crveno bela (89,56 mg/L). Krave rase džerzej su imale relativno visok nivo laktoferina (103,48 mg/L), kao i drugih antimikrobnih proteina, pogotovo lizozima.

Pored toga, visokomlečne prvotelkinje imaju dva do tri puta nižu koncentraciju laktoferina u kolostrumu u odnosu na krave sa više partusa. Razlika u nivou laktoferina nije uočljiva kod tovnih rasa goveda. Osim niskog nivoa laktoferina, mleko prvotelkinja je siromašno i drugim antimikrobnim proteinima, kao što su imunoglobulini i lizozim (Król i sar., 2010, 2012). Starije krave (npr. krave u četvrtoj laktaciji) produkuju mleko koje je bogatije ovim proteinima. Najveće koncentracije laktoferina u kolostrumu je zabeleženo kod krava u drugoj laktaciji, dok posle treće laktacije nije primećena razlika u sadržaju laktoferina (Tsuji i sar., 1990). Drugi autori navode da je nivo laktoferina veći tokom treće, četvrte i pete laktacije u odnosu na prvu i drugu (Cheng i sar., 2008).

Produkcija mleka isto utiče na nivo laktoferina u mleku i oni su u negativnoj korelaciji (Harmon i sar., 1975, Cheng i sar., 2008), što znači da se sa povećanjem dnevne produkcije mleka smanjuje sadržaj laktoferina u mleku.

### **2.6.7.2. Odnos broja somatskih ćelija i koncentracije laktoferina u mleku krava**

Somatske ćelije u mleku predstavljaju indikator zdravlja vimena krava, kao i kvaliteta mleka. Mleko iz zdravih četvrti mlečne žlezde sadrži mali broj somatskih ćelija (50 000 - 200 000/mL). Na osnovu Pravilnika o kvalitetu sirovog mleka (Sl. glasnik RS, br. 21/2009), sirovo kravlje mleko ne sme da sadrži više od 400 000 somatskih ćelija po mililitru. Prisustvo somatskih ćelija mleka ima uticaj na sadržaj imunoaktivnih proteina. Povećan broj somatskih ćelija u mleku dovodi do povećanja sadržaja laktoferina u mleku, kao i lizozima i IgG, gde laktoferin može poslužiti kao indikator kod intramamarnih infekcija krava (Hagiwara i sar., 2003, Chan i sar., 2008). Lindmark-Mansson i sar. (2000) ističu da je povećanje broja somatskih ćelija u mleku rezultat smanjene produkcije mleka, koje su praćene i promenama u njegovom hemijskom sastavu. Posledično, sa povećanjem broja somatskih ćelija, povećava se i broj neutrofilnih granulocita koji sintetišu laktoferin. Harmon i Newbould (1980) navode da je povećanje somatskih ćelija (neutrofila) i laktoferina povezano sa zapaljenskom reakcijom mlečne žlezde tokom infekcija, pošto se tada povećava produkcija tkiva vimena, a ne samo da je rezultat smanjene proizvodnje mleka. Suriyasathaporn i sar. (2000) ukazali su da je povećan rizik od nastanka kliničkog mastitisa kod krava čije mleko sadrži veoma mali broj somatskih ćelija, a da pri tome ne pokazuju znake inflamacije vimena. Zbog postojanja korelacije između sadržaja somatskih ćelija i koncentracije laktoferina u mleku, i njegov nivo je mali. Na osnovu toga, i niske koncentracije laktoferina u mleku mogu nagovestiti na povećan rizik od pojave kliničke forme mastitisa.

### **2.6.7.3. Odnos koncentracije citrata i laktoferina u mleku krava**

Citrati su prisutni u mleku i predstavljaju jedan od glavnih puferskih sistema za regulisanje ravnoteže između jona kalcijuma i vodonika (Faulkner i Peaker, 1982), održavajući puferski kapacitet mleka. Efikasnost laktoferina u mlečnoj žlezdi je u negativnoj korelaciji sa sadržajem citrata u mleku (Bishop i sar., 1976). Koncentracija citrata zavisi od stadijuma laktacije, pri čemu su najveće vrednosti zabeležene od partusa do sredine laktacije (2,38 mg/mL), a najmanje tokom perioda zasušenja (oko 0,50 mg/mL) (Nonnecke i Smith, 1984). Sa druge strane, bikarbonati olakšavaju

vezivanje jona gvožđa od strane laktoferina (Cheng i sar., 2008). Tokom laktacionog ciklusa, odnos između laktoferina, citrata i bikarbonata se menja. Antibakterijski efekat laktoferina je najizraženiji tokom perioda involucije mlečne žlezde, kada je njegova koncentracija najveća, kao i koncentracija bikarbonata, dok je koncentracija citrata smanjena (Kutila i sar., 2003a). U tom periodu, citrati se absorbuju iz vimena u krv istovremeno sa prelaskom bikarbonata iz krvi u mlečnu žlezdu. Istraživanja su pokazala da je za bakteriostatsko dejstvo laktoferina mnogo značajniji molarni odnos citrata i laktoferina nego njihova koncentracija (Bishop i sar., 1976; Nonnecke i Smith, 1984). Inhibicija bakterijskog rasta zavisi od vrednosti molarnog odnosa; što je on manji, efikasnija je inhibicija. Molarni odnos citrata i laktoferina opada sa involucijom mlečne žlezde, a raste sa laktogenezom (Kutila i sar., 2003a). U mleku i kolostrumu molarni odnos iznosi oko 1 000, dok u sekretu potpuno zasušene mlečne žlezde iznosi od 10 do 20 (Nonnecke i Smith, 1984).

#### **2.6.7.4. Način držanja krava i koncentracija laktoferina u mleku**

Način držanja, kao faktor sredine, ima velik uticaj na prinos mleka i njegov hemijski sastav. Istraživanja jedne grupe autora su ukazala da slobodan način držanja životinja poboljšava kvalitet mleka što prati i povećanje nivoa antimikrobnih proteina u njemu (Król i sar., 2010, 2012), dok drugi autori navode da je nivo laktoferina u mleku veći kod intenzivnog sistema držanja (Turner i sar., 2003; Wielgosz-Groth i sar., 2009). Značajno povećanje laktoferina je nađeno u mleku krava koje su imale neograničen pristup napasanju (*ad libitum*). Pored toga, način zasušenja mlečne žlezde krava utiče na sadržaj laktoferina u mleku. Istraživanja Newman i sar. (2009) ukazuju da je postepen prestanak muže životinja sa restriktivnom ishranom uspešniji način zasušenja koji dovodi do smanjenja proizvodnje mleka, a sa time i do povećanja koncentracije laktoferina u mleku, nego nagli prestanak muže.

#### **2.6.8. Koncentracija laktoferina u mlečnom sekretu tokom intramamarne infekcije**

U savremenoj govedarskoj proizvodnji, mastitis predstavlja jednu od najznačajnijih i najaktuelnijih bolesti muznih krava koja nanosi velike ekonomske gubitke. Le Gard (1938) je izneo podatke da mastitis kod visokomlečnih krava nanosi

veće gubitke u odnosu na tuberkulozu i brucelozu goveda. Pored smanjenja kvaliteta mleka i njene bezbednosti, ova bolest utiče i na dobrobit životinja i jedan je od glavnih razloga za primenu antibiotika kod muznih krava. Mastitis je zapaljenski proces u mlečnoj žlezdi koji najčešće predstavlja odgovor na bakterijsku intramamarnu infekciju. Zapaljenje mlečne žlezde najčešće nastaje kada patogeni mikroorganizmi dospeju preko sisnog kanala u vime, prevaziđu njegove odbrambene mehanizme, počnu da se razmnožavaju i da produkuju toksine koji oštećuju tkivo vimena (Nielsen, 2009). Najznačajniji uzročnici mastitisa su mikroorganizmi velike patogenosti (*major mastitis pathogens*) *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus agalactiae* kontagiozni patogeni (*contagious pathogens*), i *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli* i *Enterococcus*- patogeni iz okruženja (*environmental pathogens*). U poslednje vreme, zabeleženo je značajno povećanje infekcija vimena sa uzročnicima male patogenosti (*minor mastitis pathogens*), kao što su *Corynebacterium* spp. i koagulaza-negativne stafilokoke, najverovatnije zbog smanjenja prevalencije infekcija vimena sa uzročnicima velike patogenosti (Pyörälä i Taponen, 2009; Katić, 2012; Reyher i sar., 2012; Indriss i sar., 2013). Maćešić i sar. (2012) navode sve veći značaj uzročnika iz okruženja u epidemiologiji mastitisa kod krava. Ozbiljnost bolesti zavisi od interakcije infektivnog agensa, domaćina i okoline. Mlečna žlezda je najpodložnija nastanku novih intramamarnih infekcija tokom perioda rane involucije (prve dve nedelje) i pred sam partus (Gaunt i sar., 1980). U tom periodu, pojava infekcija mlečne žlezde je i do sedam puta učestalija nego u periodu laktacije. Za vreme involucije vimena, povećava se koncentracija antibakterijskih komponenti sekreta mlečne žlezde (polimorfonuklearni leukociti, imunoglobulini, laktoferin) koji je štite od nastanka intramamarne infekcije, pogotovo uzrokovane koliformnim bakterijama (Nickerson, 1989; Cheng i sar., 2008). Potpuno zasušena mlečna žlezda je otporna na uzročnike mastitisa.

Tokom intramamarne infekcije se uočava značajno povećanje koncentracije laktoferina zavisno od ozbiljnosti upalnih procesa u vimenu (Harmon i sar., 1975; Gaunt i sar., 1980; Harmon i Newbould, 1980). Koncentracija laktoferina kod mastitičnih krava se drastično povećava sa 0,66 mg/mL prvog dana infekcije na 1,89 mg/mL koja se uočava trećeg dana mastitisa (Harmon i sar., 1975). Povećanje koncentracije laktoferina se objašnjava njegovom pojačanom proizvodnjom u epitelnim ćelijama mlečne žlezde

stimulisane infekcijom, kao i aktivacijom neutrofilnih granulocita i oslobađanjem laktoferina iz njihovih sekundarnih granula (Lash i sar., 1983).

Prema istraživanjima Kawai i sar. (1999) i Hagiwara i sar. (2003) koncentracija laktoferina u mleku krava sa subkliničkim mastitisom iznosila je 0,2-1,2 mg/mL što je znatno veća od njegove vrednosti u mleku zdravih životinja. Pored toga, ovi autori su dokazali da mleko iz inficirane četvrti sa *Mycoplasma bovis*, *Staphylococcus aureus* i streptokokama ima značajno veću koncentraciju laktoferina od četvrti inficiranih koagulaza negativnim stafilokokama i *Corynebacterium bovis*. Koncentracija laktoferina u mleku krava sa kliničkim mastitisom je znatno veća nego kod zdravih krava, kao i sa subkliničkim mastitisom i kreće se u granicama od 0,3 do 2,3 mg/mL (Harmon i sar., 1975; Kawai i sar., 1999). Signifikantna razlika u koncentraciji laktoferina u mleku zdravih krava i krava sa subkliničkim i kliničkim mastitisom može biti povezana sa ozbiljnošću zapaljenskog procesa, kao i sa virulencijom samog uzročnika. Kod perakutnog mastitisa sa *E. coli*, koncentracija laktoferina u mleku je bila značajno manja nego kod životinja sa akutnim mastitisom. Ova koncentracija laktoferina u mleku može biti nedovoljna da inhibiše bakterijski rast, pošto se *E. coli* brzo umnožava u inficiranoj četvrti, dok se nivo laktoferina sporo povećava u ranoj fazi inflamacije (Kawai i sar., 1999).

#### **2.6.9. Kombinovana primena laktoferina i antibiotika u terapiji mastitisa**

Nekontrolisana upotreba antibiotika dovela je do povećanja prisustva patogena u životnoj sredini koja su manje osetljiva na antibakterijski efekat antibiotika. Povećana rezistencija bakterija na antibiotike otežava lečenje infekcija i zahteva pronalaženje novih antimikrobnih supstanci za njihovo suzbijanje (Lacasse i sar., 2008).

Zahvaljujući svojoj antimikrobnoj aktivnosti protiv mnogih mikroorganizama, pogotovo gram negativnih i gram pozitivnih bakterija, laktoferin ima potencijal da se primeni u terapiji infekcija. Diarra i sar. (2002a, 2002b) navode da se egzogeni laktoferin može primeniti kao korisno sredstvo u tretmanu mastitisa krava, dok Kai i sar. (2002) ukazuju na značaj njegove aplikacije u preventivi mastitisa u zasušnom periodu mlečne žlezde. Period rane involucije mlečne žlezde je kritičan za nastanak novih intramamarnih infekcije pošto je koncentracija endogenog laktoferina niska, te bi



aplikacija egzogenog laktoferina mogla sprečiti nastanak infekcija, odnosno limitirati metabolizam i rast bakterija. Koncentracija laktoferina je najveća na polovini perioda involucije mlečne žlezde, kada su i veoma retki klinički oblici mastitisa. Pored toga, visoke koncentracije laktoferina pospešuju fagocitnu aktivnost polimorfonuklearnih leukocita i makrofaga koja je jedna od značajnih komponenti urođenog odbranbenog mehanizma domaćina.

Koliformne bakterije pokazuju najveću osetljivost na antibakterijski efekat laktoferina. Istraživanja Bishop i sar. (1976) u *in vitro* uslovima ukazuju da dodavanje apolaktoferina u koncentraciji od 0,02-0,2 mg/mL kulturi koliformnih bakterija inhibira njihov rast, pri čemu holiforma laktoferina ne ispoljava bakteriostatski efekat. Glavni mehanizam antibakterijske aktivnosti laktoferina u slučaju koliformnih infekcija mlečne žlezde je restrikcija jona gvožđa bakterijama. Slične rezultate dobili su i Kutila i sar. (2003b) gde su većina izolata *E. coli* bila potpuno inhibirana sa 0,1 mg/mL apolaktoferina. Nasuprot ovim istraživanjima, Sanchez i Watts (1999) nisu uočili bakteriostatski efekat aplikovanog laktoferina u koncentraciji 0,5-3 mg/mL protiv tri soja *E. coli* izolovanih iz mlečne žlezde krava. Kombinovana aplikacija 1 mg/mL laktoferina i antibiotika (novobiocin, cefapirin) deluje sinergično i bakteriocidno na *E.coli*.

Određeni patogeni vimena, kao što su *Streptococcus uberis* i *Streptococcus agalactiae* su rezistenti na antimikrobnu aktivnost apoforme laktoferina (Rainard, 1986). Rezistencija mnogih gram-pozitivnih bakterija se objašnjava sposobnošću njihovog rasta u uslovima niske koncentracije jona gvožđa, kao i posedovanjem proteina koji vezuju laktoferin i transferin iz mlečnog seruma vimena krava. *Streptococcus uberis* poseduje dva značajna proteina koji vezuju laktoferin (*lactoferrin-binding proteins*; LBPs) (Park i sar., 2002). Patel i sar. (2009) su u *in vitro* ispitivanjima ukazali da je povećana sposobnost adhezije *Str. uberis* na epitelne ćelije vimena u prisustvu laktoferina, gde laktoferin služi kao veza između njih.

Antibakterijska aktivnost laktoferina u vidu inhibicije metabolizma i rasta stafilokoknih bakterija je izražena u manjem stepenu. *Staphylococcus aureus*, kao jedan od glavnih patogena vimena krava, je u mogućnosti da raste u uslovima ekstremno niskim koncentracijama jonima gvožđa, kao i u prisustvu gvožđe helatora (EDTA) u

visokim koncentracijama (Diarra i sar., 2002a). Pored toga, određeni sojevi *Staphylococcus aureus* su rezistentni na  $\beta$ -laktamske antibiotike pošto produkuju  $\beta$ -laktamaze, enzime koji hidrolizuju  $\beta$ -laktamski prsten penicilina (Petitclerc i sar., 2007). Ispitivanja Diarra i sar. (2002b) su dokazala da postoji sinergični efekat između laktoferina i penicilina G protiv tri izolata *Staphylococcus aureus* izolovanih iz mleka mastičnih krava. Kombinovana primena laktoferina (0,5-1 mg/mL) sa penicilinom G povećava inhibitornu aktivnost antibiotika dva do četiri puta pri čemu lakše dovodi do redukcije bakterijskog rasta. Aplikacija jona gvožđa ili gvožđe helatora nisu imali efekat na antibakterijsko dejstvo laktoferina i penicilina G. Ova istraživanja su ukazala da laktoferin ili laktofericin u kombinaciji sa  $\beta$ -laktamskim antibioticima može povećati antibakterijski efekat ovih antibiotika protiv određenih sojeva *Staphylococcus aureus* koji su rezistentni na antibiotike, kao i da se primeni u terapiji i prevenciji infekcija mlečne žlezde krava. Petitclerc i sar. (2007) su isto ispitali efekat intramamarnе aplikacije penicilina G (100,000 IU) i laktoferina (1 g) tokom hroničnog mastitisa izazvanog visoko rezistentnim sojevima *Staphylococcus aureus* na  $\beta$ -laktamske antibiotike. Bakterijsko izlečenje je primećeno kod 11,1% slučajeva kad je aplikovan sam laktoferin, 9,1% kod penicilina G i kod kombinovane aplikacije laktoferina i antibiotika zabeleženo je 45,5% izlečenja. Kod krava koje su bile inficirane tokom predhodne laktacije, stopa izlečenja kod kombinovane primene je bila znatno veća (33,3%) nego kod tretmana samo antibioticima (12,5%).

Kombinovana primena laktoferina i antibiotika u terapiji, kao i u prevenciji infekcija vimena krava daje bolji rezultat nego tretman samo antibioticima ili laktoferinom. Laktoferin dovodi do strukturalnih promena ćelijskog zida bakterija koje postaju osetljivije na delovanje antibiotika (Ellison i sar., 1988).

### 3. CILJEVI I ZADACI DISERTACIJE

Zastupljenost mastitisa je u savremenom govedarstvu, kako u Republici Srbiji tako i u svetu, ekonomski najvažnija bolest visokomlečnih krava. Imajući u vidu visoke troškove do kojih ova bolest dovodi, gubitke u proizvodnji i smanjenju kvaliteta mleka, cilj istraživanja ove disertacije je procena dijagnostičke mogućnosti ultrazvučnog pregleda u detekciji subkliničkog mastitisa i poremećene sekrecije vimena, kao i razmatranje opravdanosti primene laktoferina u prevenciji i lečenju mastitisa.

Sa obzirom na cilj istraživanja, postavljeni su sledeći zadaci:

1. Ispitivanje zdravstvenog stanja vimena krava u periodu predzasušnja i posle partusa
2. Bakteriološki nalaz pojedinačnih uzoraka mleka krava u periodu predzasušnja i posle partusa
3. Određivanje broja somatskih ćelija mleka i koncentracije imunoglobulina klase G u mlečnom i krvnom serumu krava u periodu predzasušnja i posle partusa
4. Terapijska intramamarna primena antibiotika- ogledna grupa I i antibiotika i laktoferina- ogledna grupa II u periodu rane involucije mlečne žlezde

5. Određivanje koncentracije laktoferina u mlečnom serumu krava u periodu predzasušnja i posle partusa
6. Razmatranje efikasnosti primenjenih terapijskih metoda

## **4. MATERIJAL I METODE**

### **4.1. Formiranje ogledne grupe krava**

Ogled je sproveden na farmama visokomlečnih krava holštajn frizijske rase na teritoriji Autonomne pokrajine Vojvodine Republike Srbije. Na jednoj farmi krave su držane vezanim sistemom, dok je na drugoj farmi bio slobodan tip držanja životinja. Na farmi visokomlečnih krava urađeni je klinički pregled životinja, kao i dodatni metodi pregleda: Kalifornija mastitis test (CMT) i Draminski mastitis detektor test. Potom su uzeti pojedinačni uzorci mleka iz četvrti mlečne žlezde krava za bakteriološku analizu i na osnovu rezultata, životinje su podeljene u sledeće grupe:

1. Krave držane vezanim sistemom kod kojih je bakteriološkom analizom izolovan uzročnik mastitisa i primenila se terapija sa antibioticima. (ogledna grupa I);
2. Krave držane slobodnim sistemom kod kojih je bakteriološkom analizom izolovan uzročnik mastitisa i primenila se terapija sa antibioticima i goveđim laktoferinom (ogledna grupa II);

## 4.2. Klinički pregled krava

Kliničkim pregledom izvršena je procena opšteg zdravstvenog stanja krava, kao i ispitivanje mlečne žlezde adspekcijom i palpacijom. Adspekcijom je procenjen površinski izgled, veličina i simetrija vimena, pri čemu je posebna pažnja posvećena na eventualne povrede sisa i vimena. Palpacija vimena krava vršena je odmah posle muže, pri čemu je procenjena temperiranost, bolnost i konzistencija parenhima mlečne žlezde. Pregled vimena, u cilju procene njene konzistencijese, vršila se sa obe ruke, pri čemu je dlan jedne ruke postavljen sa unutrašnje strane, a drugi sa spoljašnje strane vimena. Pri pregledu kože vimena, palcem i kažiprstom jedne ruke je koža razvučena. Ona se lako odvajala od okoline, suprotno, ukazivala je na pojavu otoka vimena. Svi podaci dobijeni kliničkim pregledom uneti su u interni karton životinje (Prilog 1).

Kod sumnje na postojanje intramamarne infekcije, pored opšteg kliničkog pregleda krava i pregleda mlečne žlezde, vršen je pregled supramamarnih limfnih čvorova, te mleka Kalifornija mastitis testom, kao i određivanjem električne provodljivosti mleka. Palpacija limfnih čvorova mlečne žlezde, koje se nalaze iznad baze zadnjih četvrti vimena u perinealnoj regiji, izvela se vrhovima prstiju pri čemu je posebna pažnja posvećena na limfne čvorove koji su dublje smešteni.

## 4.3 Brzi testovi za otkrivanje poremećene sekrecije vimena i subkliničkih mastitisa

Pre uzimanja uzoraka sekreta mlečne žlezde krava za bakteriološku analizu, urađeni su brzi testovi za otkrivanje poremećene sekrecije i subkliničkih mastitisa.

### 4.3.1. Kalifornija mastitis test (*California mastitis test* - CMT)

Kalifornija mastitis test je brz, jednostavan i pouzdan metod za otkrivanje poremećene sekrecije, kao i pojave subliničkog mastitisa u pojedinačnim četvrtima vimena krava. Na osnovu rezultata CMT testa, može se indirektno proceniti broj somatskih ćelija mleka koje predstavljaju indikator zdravstvenog stanja mlečne žlezde i kvaliteta mleka. Test se zasniva na dejstvu površinski aktivne materije (alkilaryl sulfonat) na DNK polimer iz leukocita, pri čemu se odvaja DNK, a proteinski deo spontano prelazi u gel.

#### 4.3.1.1. Postupak rada i interpretacija rezultata

Pre pristupanju izvođenja testa, proveravala se prohodnost papile mlečne žlezde. Prvi mlaz mleka se odbacio, a potom se mleko iz svake četvrti vimena uzimalo u pojedinačan odeljak testatora. Odeljci testatora su se obeležavali A, B, C i D radi lakše identifikacije četvrti vimena od kojih su uzeti uzorci. U svaki odeljak testatora se uzelo mleko u količini oko 2 mL iz svake četvrti vimena, koja se postigla naginjanjem testatora skoro vertikalno pri čemu se višak mleka odlivao. Potom se pažljivo, bez stvaranja mehurića, dodala jednaka količina CMT reagensa i mešavina se nežno rotirala 10-20 sekundi. Očitavanje rezultata se radilo na osnovu promene konzistencije mleka i morala se uraditi odmah, jer se u narednih 20 sekundi vidljiva reakcija gubi. Interpretacija rezultata CMT testa je prikazana u tabeli 4.

**Tabela 4.** Interpretacija rezultata CMT testa

Reakcija	Promena konzistencije mleka	Broj somatskih ćelija / mL
Negativna (- ili N)	Bez promena u konzistenciji, mešavina ostaje tečna i homogena	0 - 200 000
U tragovima (T)	Neznatna promena u konzistenciji pri pomeranju posude	200 000 - 400 000
Slabo pozitivna (+)	Pojačano zgrušavanje bez pojave gela	400 000 - 1 200 000
Pozitivna (++)	Stvaranje gela koji se skuplja na sredini posude tokom mešanja, ali se razilazi prestankom mešanja	1 200 000 - 5 000 000
Jako pozitivna (+++)	Stvaranje guste želatinozne mase koja se skuplja na sredini posude pri mešanju i ne razilazi se po prestanku mešanja	>5 000 000

#### 4.3.2. Električna provodljivost mleka određena Draminski mastitis detektorom

Saznanje da pojava subkliničkog mastitisa dovodi do promena nivoa soli u mleku pri čemu se menja njena električna provodljivost, dovelo je do razvoja električnih mernih instrumenata koji veoma precizno određuju električnu provodljivost mleka. Indirektno, na taj način se detektuje pojava subkliničkog mastitisa kod krava. Tokom intramamarnih infekcija menja se hemijski sastav mleka, pri čemu se povećava

koncentracija jona natrijuma i hlora u mleku, a smanjuje se koncentracija jona kalijuma i laktoze, dovodeći do povećanja električne provodljivosti, odnosno do smanjenja električne otpornosti mleka. Radi otkrivanja mastitisa, tokom poslednjih dvadeset godina, koristi se metoda određivanja električne provodljivosti mleka, koja je obrnuto proporcionalna električnoj otpornosti mleka.

Draminski mastitis detektor je elektronski instrument koji meri električnu otpornost mleka i sastoji se iz posudice sa elektrodama, elektronske jedinice sa LCD ekranom i drške u kojoj se nalazi baterija i prekidač.

#### 4.3.2.1. Postupak rada i interpretacija rezultata

Postupak rada sa Draminski mastitis detektorom je jednostavan. Za analizu se uzelo najmanje 15 mL mleka. Koristio se prvi mlaz mleka, pošto daje najpreciznije očitavanje. Kasniji uzorci mleka potiču iz cisterne vimena i kanalikularnog sistema parenhima koji su često neinficirani, pa takvo mleko može da da drugačije rezultate. Draminski mastitis detektor se uključio, potom se u posudicu uzeo uzorak iz svake četvrti vimena krava i posle jedne sekunde se na ekranu pojavio rezultat. Interpretacija rezultata je prikazana u tabeli 5.

**Tabela 5.** Interpretacija rezultata dobijeni Draminski mastitis detektorom

Očitani rezultat	Značenje
Iznad 300	Uzorak mleka je visokog kvaliteta i incidenca subkliničkog mastitisa izuzetno niska
250-300	Povećanje incidence subkliničkog mastitisa sa smanjenjem rezultata
Ispod 250	Subklinički mastitis koji prelazi u klinički stadijum pri čemu je broj somatskih ćelija preko 1 000 000/ mL

#### 4.3.3. Ispitivanje senzitivnosti i specifičnosti Kalifornija mastitis testa i Draminski mastitis detektora

Senzitivnost (osetljivost) testa predstavlja sposobnost testa da otkrije sve pozitivne, odnosno inficirane jedinke, dok specifičnost testa se ogleda u njegovoj mogućnosti da detektuje sve negativne, odnosno zdrave krave (Bačić, 2009; Fosgate i sar., 2013).



Ispitivanje senzitivnosti i specifičnosti indirektnih testova za određivanje poremećene sekrecije vimena i subkliničkog mastitisa rađena je na osnovu sledećih formula (Sharma i sar., 2010):

$$\text{Senzitivnost} = \frac{\text{pozitivno}}{\text{pozitivno} + \text{lažno negativno}} \times 100$$

$$\text{Specifičnost} = \frac{\text{negativno}}{\text{negativno} + \text{lažno pozitivno}} \times 100$$

$$\text{Validnost} = \frac{\text{pozitivno} + \text{negativno}}{\text{pozitivno} + \text{lažno pozitivno} + \text{negativno} + \text{lažno negativno}} \times 100$$

Vrednosti se izražavaju u procentima (%).

#### 4.4. Ultrazvučni pregled mlečne žlezde krava

Na farmi krava urađen je ultrazvučni pregled mlečne žlezde krava kako bi se dijagnostikovala poremećena sekrecija vimena, odnosno subklinička i klinička forma mastitisa. Pri pregledu koristio se ultrazvučni aparat *Esaote pie medical - falco* (Holandija) i linearna sonda od 6 - 8 MHz. Ultrasonografija vimena krava urađena je nakon kliničkog i laboratorijskog pregleda, kada su se utvrdile životinje sa kliničkim i subkliničkim oblikom mastitisa.

##### 4.4.1. Postupak rada

Pre ultrazvučnog pregleda, vime krava se očistilo i operalo od nečistoća, i po potrebi ošišala dlaka. Potom se aplikovao gel za ultrazvučni pregled na ultrazvučnu sondu i kožu vimena kako bi se osigurao dobar kontakt između sonde i kože.

Ultrazvučni pregled parenhima mlečne žlezde i supramamarnih limfnih čvorova se izvodio metodom direktnog kontakta (transkutana ehografija) sa linearnom sondom frekvencije 6 - 8 MHz (Slika 26). Tokom ultrazvučnog pregleda, sonda se postavljala u proksimalno distalni i kranio kaudalni položaj i pomerala u svim pravcima po površini kože vimena kako bi se izvršila vizualizacija celog parenhima vimena (Fasulkov, 2012). Ultrazvučna sonda se tokom pregleda supramamarnih limfnih čvorova postavila u dorzokaudolnom predelu baze vimena na osnovu opisa Bradley i sar. (2001).



**Slika 26.** Ultrazvučni pregled parenhima mlečne žlezde (Orig.)

Za ultrazvučnu vizualizaciju strukture papile vimena koristila se metoda „vodenog kupatila (*water bath*)“ i linearna sonda frekvencije 6 - 8 MHz (Slika 27). U plastičnu čašu se sipala topla voda (30°C-35°C) u koju se potapala papila vimena, pri čemu je sonda bila u kontaktu sa površinom čaše. Sonda se postavila u longitudinalni i transverzalni položaj. Ova metoda omogućava bolji i kvalitetniji prikaz papila mlečne žlezde pošto se izbegava njena deformacija koja se javlja kod direktne metode.



**Slika 27.** Ultrazvučni pregled papile mlečne žlezde (Orig.)

#### 4.5. Uzimanje uzoraka mleka od krava u ogledu

Ispitivanje je rađeno na grupi visokomlečnih krava holštajn frizijske rase na teritoriji Autonomne pokrajine Vojvodine Republike Srbije. Prateći proizvodni ciklus, dvokratno su uzimani uzorci sekreta mlečne žlezde krava u fazi predzasušavanja, kao i od istih krava tokom perioda rane laktacije.

Od svih krava u ogledu uzeti su dvojni uzorci sekreta mlečne žlezde za vreme jutarnje muže bez obzira na rezultat CMT testa ili nalaz Draminski mastitis detektora.

Uzorci mleka za bakteriološku analizu uzeti su aseptično iz sisnog kanala svake četvrti vimena u sterilne epruvete. Pre uzimanja uzoraka, izvršeno je čišćenje i dezinfekcija sisa vimena upotrebom 70% alkohola, sa posebnom pažnjom na sfinkter papile. Pri dezinfekciji papila poštovano je pravilo „ka sebi“ kako bi se izbegla naknadna kontaminacija već dezinfikovane papile rukom za vreme postupka dezinfekcije ostalih papila. Prvo su obrisane papile sa udaljenije strane vimena, a potom bliže i to prvo prednja, pa zadnja papila.

Uzimanje uzoraka mleka vršeno je redosledom „od sebe“, odnosno prvo su uzeti uzorci mleka iz papila koje su bliže, a potom iz daljih papila. Prvi mlaz mleka se odbacio, a potom je iz svake četvrti vimena uzeto nekoliko mililitara mleka, pri čemu su se epruvete postavljale gotovo u horizontalni položaj. Uzorci su obeleženi ID brojem krave i na temperaturi frižidera (4°C) dostavljeni u laboratoriju na analizu. Bakteriološka obrada uzoraka odrađena je u laboratoriji za kliničku bakteriologiju, mikologiju i parazitologiju Naučnog instituta za veterinarstvo „Novi Sad“ u Novom Sadu.

Drugi uzorci namenjeni za određivanje koncentracije laktoferina i imunoglobulina G klase su dostavljeni u laboratoriju za higijenu namirnica animalnog porekla na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu. Po dospeću u laboratoriju, uzorci mleka su stavljeni u frižider na temperaturu od 4°C do 8°C i naredni dan su centrifugovani na 3 000 obrtaja u minutu u trajanju od 45 minuta. Mlečni serum se potom odlio u epruvete koje su obeležene ID brojem krave i stavljeni na čuvanje na temperaturi od -20°C.

#### 4.6. Određivanje broja somatskih ćelija u uzorcima mleka

Određivanje broja somatskih ćelija u uzorcima mleka urađeno je u laboratoriji za ispitivanje stočne hrane i animalnih proizvoda na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu korišćenjem aparata fosomatik (*Fossomatic 5000*). Aparat radi na principu protočne citometrije (*flow cytometry*), a zasniva se na prolasku uzorka u vrlo tankoj niti ispred merne jedinice. Na početku procesa, uzorak mleka se boji fluorescentnom bojom koja se vezuje za DNK molekula i pomoću prenosnog fluida se potiskuje pod velikim pritiskom u tanku kivetu. Zahvaljujući tome, somatske ćelije prolaze samo jedna po jedna. Prilikom prolaska ispred merne jedinice, uzorak mleka u tankoj kiveti izložen je plavom svetlu koji dovodi do ekscitacije fluorescentne boje. Pri tome somatske ćelije emituju crveno svetlo koje se registruje kao svetlosni impuls preko fotodetektora. Svetlosni impulsi iz obojenih somatskih ćelija bivaju pojačani, izbrojani i konvertovani u broj somatskih ćelija u mililitru mleka.

#### 4.7. Bakteriološki pregled uzoraka mleka na uzročnike mastitisa

Bakteriološka obrada uzoraka mleka urađena je u laboratoriji za kliničku bakteriologiju, mikologiju i parazitologiju Naučnog instituta za veterinarstvo „Novi Sad“ u Novom Sadu.

Uzorci mleka su se zasejavali odmah po prijemu u laboratoriju, a najkasnije 24 sata pri čemu su se čuvali na temperaturi frižidera, odnosno na temperaturi od 4°C do 8°C. Pre zasejavanja na podloge, uzorci su temperirani u vodenom kupatilu petnaest minuta pri temperaturi od 37°C i homogenizovni.

Od svakog uzorka mleka zasejano je 0,1 mL mleka po površini dva krvna agara sa 5% ovčije krvi, na MacConkey agar i Sabouraud dextrose agar (*Oxoid, UK*). Zasejavanje se vršilo tako što se većom omčastom ezom napravio primarni trougao na podlozi, te se potom manjom ezom napravio novi trougao u pravcu kretanja kazaljke na satu prevlačenjem preko primarnog trougla. Bakteriološka eza se sterilisala opaljivanjem na plamenu, ohladila i napravio treći trougao tako što se ona prevukla preko drugog trougla. Jedna krvna ploča se inkubirala u mikroaerofilnim uslovima na

temperaturi od 37°C, dok se druga krva ploča, MacConkey agar i Sabouraud dextrose agar, inkubirali aerobno na temperaturi od 37°C. Inkubacija ploča trajala je 24 do 48 sati za rast i izolaciju bakterija, dok su se ploče inkubirali do pet dana za rast i izolaciju gljivica. Ploče su se pregledale na porast bakterija ili gljivica u intervalima od 24 sati.

#### **4.7.1. Izolacija i identifikacija bakterije *Staphylococcus aureus***

Dijagnostički postupak izolacije i identifikacije bakterije *Staphylococcus aureus* obahvata njenu izolaciju na bakteriološkim podlogama, mikroskopski pregled, biohemijsko ispitivanje i test koagulacije plazme kunića.

*Staphylococcus aureus* lako raste na krvnom agaru sa 5% ovčije krvi u aerobnim uslovima pri čemu su kolonije vidljive za 24 sata inkubacije. Kolonije *Staphylococcus aureus* su velike, okrugle, glatke i sjajne, pigmentirane belim ili zlatno - žutim pigmentom. *Staphylococcus aureus* proizvodi različite tipove homolize (alfa, beta, gama i delta). Na krvnom agaru sa eritrocitima ovna, dejstvom alfa i beta hemolizina stvara se dupla zona hemolize.

##### **4.7.1.1. Testovi katalaze i oksidaze**

Test katalaza koristi se za detekciju enzima katalaze koji rastvara vodonik peroksid na vodu i kiseonik. Kolonija karakterističnog izgleda za koju se pretpostavlja da je kolonija *Staphylococcus aureus* se preseje sa krvnog agara na hranljivu (neutralnu) podlogu. Test oksidaze i katalaze radi se na izraslim kolonijama na neutralnom agaru sa 3% vodonik peroksidom. Pozitivna reakcija se manifestuje pojavom mehurića gasa (kiseonik). *Staphylococcus aureus* je oksidaza negativna i katalaza pozitivna bakterija.

##### **4.7.1.2. Mikroskopski izgled**

*Staphylococcus aureus* je Gram pozitivna koka, prečnika oko 1 µm, raspoređena pojedinačno, u parovima ili u vidu nakupina koje podsećaju na grozdove.

##### **4.7.1.3. Test koagulacije plazme kunića**

Za dokazivanje koagulaze koristila se liofilizovana plazma kunića proizvođača Veterinarski zavod Zemun a. d., Beograd, pri čemu se ampula sa 1 mL liofilizovane plazme rekonstruisala sa 1 mL destilovane vode. Kada se liofilizat rastvorio, napravilo se

razređenje sa destilovanom vodom u odnosu 1:5. Od nastalog razređenja se 0,5 mL sipalo u epruvetu, te se bakteriološkom ezom dodao komadić ispitivane kolonije. Inkubacija traje 24 sata na temperaturi od 37°C, pri čemu se posmatranje vrši u intervalima od jedan sat. Prilikom svakog izvođenja testa koagulacije plazme kunića, postavljaju se pozitivna i negativna kontrola uporedo sa ispitivanim sojevima *Staphylococcus* vrsta. Pozitivnu kontrolu čini razređena plazma sa kontrolnim sojem *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), a negativna kontrola je rastvorena neinokulisana plazma. Pozitivna reakcija se manifestuje pojavom koaguluma koji zauzima više od polovine prvobitne zapremine tečnosti.

#### **4.7.1.4. Fenotipske karakteristike**

Svaki izolat karakterističnih kulturelnih osobina i izgleda pod mikroskopom, ispituje se na fenotipske karakteristike u poređenju sa referentnim sojem *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Tabela 6).

**Tabela 6.** Fenotipske karakteristike za identifikaciju *Staphylococcus aureus*  
(Markey i sar., 2013)

Fenotipske karakteristike	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
Katalaza test	+
Oksidaza test	-
Mikroskopski izgled	Gram pozitivne koke (0,5-1 µm u prečniku) koje se zapažaju kao pojedinačne, u parovima i iregularnim nakupinama.
Test koagulacije plazme u epruveti	+
Fermentacija manitola	+
Osetljivost na novobiocin	S (soj je osetljiv na novobiocin (S), ako je zona inhibicije oko diska 16 mm i veća)
Osetljivost na <i>polymyxin B</i>	R (soj je rezistentan na <i>polymyxin B</i> (R) ako je zona inhibicije oko diska manja od 10 mm)
Laktoza	+
Rafinoza	+
Salicin	-
Sorbitol	-
Trehaloza	+
Ksilaza	-

Osnovne diferencijalne karakteristike stafilokoka koje su najčešće izolovane iz uzoraka mleka prikazane su u prilogu 2.

#### 4.7.2. Izolacija i identifikacija bakterije *Streptococcus agalactiae*

Dijagnostički postupak izolacije i identifikacije bakterije *Streptococcus agalactiae* obahvata njenu izolaciju na bakteriološkim podlogama, mikroskopski pregled i biohemijsko ispitivanje.

*Streptococcus agalactiae* lako raste na krvnom agaru sa 5% ovčije krvi, dok na MacConkey agaru ne raste, ali se uzorci zasejavaju kako bi se izolovale gram negativne vrste. Inkubacija traje 24 do 48 sati na temperaturi od 37°C u aerobnim uslovima, iako *Streptococcus agalactiae* raste i u mikroaerofilnim uslovima. Kolonije *Streptococcus*

*agalactiae* su sitne, okrugle, glatke i prozračne, oko kojih se mogu javiti različiti tipovi hemolize eritrocita (alfa, beta i gama hemoliza).

#### 4.7.2.1. Testovi katalaze i oksidaze

Kolonija karakterističnog izgleda se preseje sa krvnog agara na hranljivu podlogu. Test oksidaze i katalaze radi se na izraslim kolonijama na neutralnom agaru sa 3% vodonik peroksidom. Pozitivna reakcija se manifestuje pojavom mehurića gasa (kiseonik). *Streptococcus agalactiae* je oksidaza negativna i katalaza negativna bakterija.

#### 4.7.2.2. Mikroskopski izgled

*Streptococcus agalactiae* je Gram pozitivna sferična koka, prečnika 0,5 - 2  $\mu\text{m}$ , koja formira karakteristične duže ili kraće lance. *Streptococcus agalactiae* je asporogena i nepokretna bakterija.

#### 4.7.2.3. CAMP test

CAMP test ima za cilj identifikaciju i diferencijaciju *Streptococcus agalactiae* od ostalih streptokoka. Za izvođenje testa koristi se krvni agar sa 5% ovčije krvi sa dodatkom gvožđe citrata i 0,1% eskulina. Na krvni agar zaseje se vertikalno po sredini ploče poznati soj *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), a horizontalno kontrolni soj *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 i ispod njega ispitujući soj *Streptococcus*. Ploča se inkubira tokom 18 do 24 sata na temperaturi od 37°C u mikroaerofilnim uslovima. Pojava potpune zone hemolize u vidu strelice ili polumeseca u zoni nepotpune hemolize stafilokoka ukazuje na pozitivan CAMP test. Pored CAMP testa izvodi se i test hidrolize eskulina pošto neki sojevi *Streptococcus uberis*-a mogu dati pozitivan CAMP test. *Streptococcus agalactiae* je eskulin negativan, dok je *Streptococcus uberis* eskulin pozitivan.

#### 4.7.2.4. Fenotipske karakteristike

Za konačnu identifikaciju *Streptococcus agalactiae*, ispituju se fenotipske karakteristike u poređenju sa referentnim sojem *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813



(Tabela 7), iako one nisi neophodne ukoliko je CAMP test pozitivan, a eskulin test negativan.

**Tabela 7.** Fenotipske karakteristike za identifikaciju *Streptococcus agalactiae*  
(Markey i sar., 2013)

Fenotipske karakteristike	<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 13813
Bacitracin	R
Optohin	R
Manitol	-
Salicin	-
Saharoza	+
Laktoza	+
Sorbitol	-

Osnovne diferencijalne karakteristike streptokoka koje su najčešće izolovane iz uzoraka mleka prikazane su u prilogu 3.

#### 4.7.3. Izolacija i identifikacija bakterije *Enterococcus faecalis*

Dijagnostički postupak izolacije i identifikacije bakterije *Enterococcus faecalis* obahvata njenu izolaciju na bakteriološkim podlogama, mikroskopski pregled i biohemijsko ispitivanje.

*Enterococcus faecalis* raste na krvnom agaru sa 5% ovčije krvi. Paralelno sa krvnim agarom, uzorke treba zasejati i na MacConkey agar. *Enterococcus faecalis* probija MacConkey agar. Zasejane ploče inkubiraju se 24 - 48h na temperaturi od 37°C u aerobnim uslovima. Kolonije *Enterococcus faecalis* su sitne, sjajne, glatke i prozirne, najčešće sa nepotpunom ( $\alpha$ ) hemolizom. Kod nekih sojeva može da se javi i kompletna ( $\beta$ ) hemoliza ili potpuni izostanak hemolize.

##### 4.7.3.1. Testovi katalaze i oksidaze

Kolonija karakterističnog izgleda se preseje sa krvnog agara na hranljivu podlogu. Test oksidaze i katalaze radi se na izraslim kolonijama na neutralnom agaru sa 3% vodonik peroksidom. Pozitivna reakcija se manifestuje pojavom mehurića gasa (kiseonik). *Enterococcus faecalis* je oksidaza negativna i katalaza negativna bakterija.

#### 4.7.3.2. Mikroskopski izgled

*Enterococcus faecalis* je Gram pozitivna koka.

#### 4.7.3.3. CAMP test

*Enterococcus faecalis* ne daje CAMP fenomen.

#### 4.7.3.4. Fenotipske karakteristike

Izolati karakterističnih kulturelnih osobina i izgleda pod mikroskopom, ispituju se na sledeće fenotipske karakteristike:

**Tabela 8.** Fenotipske karakteristike za identifikaciju *Enterococcus faecalis*  
(Markey i sar., 2013)

Fenotipske karakteristike	<i>Enterococcus faecalis</i>
Inulin	-
Laktoza	+
Manitol	+
Rafinoza	-
Salicin	+
Sorbitol	+
Trehaloza	+
Hidroliza eskulina	+

#### 4.7.4. Izolacija i identifikacija bakterije *Arcanobacterium pyogenes*

Dijagnostički postupak izolacije i identifikacije bakterije *Arcanobacterium pyogenes* obahvata njenu izolaciju na bakteriološkim podlogama u aerobnim ili mikroaerofilnim uslovima, mikroskopski pregled i biohemijsko ispitivanje.

*Arcanobacterium pyogenes* raste na krvnom agaru sa 5% ovčije krvi, dok na MacConkey agaru ne raste. Inkubacija traje 24 do 72 sata na temperaturi od 37°C u aerobnim i mikroaerofilnim uslovima. Rast bakterija u mikroaerofilnim uslovima je bolji. Kolonije *Arcanobacterium pyogenes* su veoma sitne, prozirne koje vremenom postaju zamućene na sredini sa uskom zonom hemolize (oko 1 mm).

#### 4.7.4.1. Testovi katalaze i oksidaze

*Arcanobacterium pyogenes* je oksidaza negativna i katalaza negativna bakterija.

#### 4.7.4.2. Mikroskopski izgled

*Arcanobacterium pyogenes* su mali i tanki Gram-pozitivni štapići dimenzije 0,5 - 2  $\mu\text{m}$ . U vidnom polju su raspoređeni u obliku kineskih slova. Nepokretni su i ne stvaraju spore.

#### 4.7.4.3. CAMP test

Radi identifikacije bakterije *Arcanobacterium pyogenes* izvodi se dvostruki CAMP test sa bakterijama *Staphylococcus aureus* i *Rhodococcus equi* i test hidrolize eskulina. *Arcanobacterium pyogenes* pojačava efekat stafilokoknog beta-hemolizina i pravi karakterističan CAMP fenomen u obliku glavice šibice sa *Staphylococcus aureus*, a isti oblik sinergističke hemolize može dati i sa *Rhodococcus equi*. *Arcanobacterium pyogenes* ne hidrolizuje eskulin.

#### 4.7.5. Izolacija i identifikacija bakterija iz roda *Corynebacterium*

Dijagnostički postupak izolacije i identifikacije bakterija iz roda *Corynebacterium* obahvata izolaciju uzročnika na bakteriološkim podlogama u aerobnim ili mikroaerofilnim uslovima, mikroskopski pregled i biohemijsko ispitivanje. Pored toga, radi se i ispitivanje osetljivosti izolata na antimikrobne lekove.

Bakterije iz roda *Corynebacterium* rastu na krvnom agaru sa 5% ovčije krvi, dok na MacConkey agaru ne raste. Inkubacija traje 24 do 48 sati na temperaturi od 37°C u aerobnim i mikroaerofilnim uslovima. Morfološke osobine kolonija najvažnijih vrsta bakterija roda *Corynebacterium* prikazane su u tabeli 9.

**Tabela 9.** Morfološke karakteristike kolonija *Corynebacterium* spp.

(Markey i sar., 2013)

<i>Corynebacterium species</i>	<i>Morfološke karakteristike kolonija</i>
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	Male, bele, suve kolonije okružene zonom hemolize koja se ne mora zapaziti 48-72h inkubacije. Posle više dana kolonije dostižu 3mm u prečniku, mrvičaste su konzistencije i krem boje.
<i>Corynebacterium bovis</i>	Male, bele do krem boje, suve, nehemolitične kolonije
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	Male, bele kolonije koje liče na kolonije <i>C. pseudotuberculosis</i> . Pojedini sojevi mogu biti hemolitični.
<i>Corynebacterium ulcerans</i>	Male, bele kolonije sa uzanom zonom hemolize
<i>Corynebacterium renale</i>	Nehemolitične, male okrugle kolonije, tamno žute boje i mutne.
<i>Corynebacterium pilosum</i>	Kolonije su slične <i>C. renale</i> , ali su krem žute boje.
<i>Corynebacterium cystitidis</i>	Prozračno bele kolonije slične <i>C. renale</i> i <i>C. pilosum</i>
<i>Rhodococcus equi</i>	Male, glatke, sjajne i nehemolitične kolonije koje vremenom postaju krupnije, sluzave (mukoidne) i ružičaste boje.

**4.7.5.1. Testovi katalaze i oksidaze**

*Corynebacterium* spp. su katalaza pozitivni i oksidaza negativni.

**4.7.5.2. Mikroskopski izgled**

*Corynebacterium* spp. su mali pleomorfni Gram-pozitivni štapići koji se na preparatima zapažaju kao štapići, kokoidne forme ili filamenti. Mogu biti raspoređeni u vidu palisada ili u obliku kineskih slova. Sadrže metahromatske granule (depoi fosfata) na polovima. Ne stvaraju spore i nepokretni su.

**4.7.5.3. CAMP test**

Na krvnom agaru uradi se dvostruki CAMP test sa *Staphylococcus aureus* i *Rhodococcus equi*. *Rhodococcus equi* produkuje „*R. equi* faktor“ (fosfolipaza C i holesterol-oksidaza) koji sa  $\beta$ -toksinom *Staphylococcus aureus* pravi karakterističan CAMP fenomen izgleda ašova ili lopatice. *Corynebacterium renale* takođe pojačava zonu nepotpune hemolize bakterije *Staphylococcus aureus*, a *Corynebacterium pseudotuberculosis* dovodi do restrikcije hemolize bakterije *Staphylococcus aureus*.

#### 4.7.5.4. Fenotipske karakteristike

Izolati karakterističnih kulturelnih osobina i izgleda pod mikroskopom, ispituju se na sledeće fenotipske karakteristike:

**Tabela 10.** Fenotipske karakteristike za identifikaciju bakterija roda *Corynebacterium* (Markey i sar., 2013)

Fenotipske karakteristike	$\beta$ - hemoliza	Hidroliza eskulina	Urea	Glukoza	Maltoza	Saharoza
<i>Corynebacterium bovis</i>	-	-	-	+	-	-
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	varijabilno	+	+	+	+	+
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	+	-	+(>18h)	+	+	-
<i>Corynebacterium renale</i> grupa	-	-	+(<1h)	+	-	-
<i>Rhodococcus equi</i>	-	-	+(>18h)	-	-	-

#### 4.8. Intramamarna aplikacija antibiotika i laktoferina

Krave ogledne grupe I koje su u periodu zasušenja imale pozitivan bakteriološki nalaz uzoraka mleka, su nakon poslednje muže tretirane antibioticima. Aplikovan je antibiotik *Drycloxa-kel* (Kela N.V., Belgija) čiju aktivnu supstancu čini kloksacilin - benzatin 1 000 mg. Pre intramamarne aplikacije, papile vimena su temeljno očišćene i dezinfikovane, pri čemu se posebna pažnja obratila na sisni otvor. Potom se nastavak injektora uveo u sisni kanal i sadržaj ubrizgao ujednačenim pritiskom. Nakon toga, je svaka papila vimena bila potopljena u sredstvo za dezinfekciju vimena krava.

Krave ogledne grupe II koje su u periodu predzasušenja imale pozitivan bakteriološki nalaz uzoraka mleka, su nakon poslednje muže tretirane antibioticima i laktoferinom. Antibiotik *Orbenin extra dry cow* (Haupt Pharma Latina S.r.l., Italija) aplikovan je intramamarno posle detaljne dezinfekcije papile vimena. Aktivnu supstancu antibiotika čini kloksacilin - benzatin 600 mg. Pored antibiotika, životinjama ogledne grupe II urađena je i intramamarna aplikacija 10 mL rastvora govedeg laktoferina.

Antibiogram je predstavljen u prilogu 4.

#### 4.8.1. Priprema rastvora laktoferina

U laboratoriji za higijenu animalnih proizvoda na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu su se pripremili rastvori goveđeg laktoferina za intramamarnu aplikaciju bakteriološki pozitivnih životinja. U 10 mL sterilne dejonizovane vode rastvoreno je 3 mg goveđeg laktoferina, proizvođača *Sigma-Aldrich* (Slika 28). Pre aplikacije, rastvor se ugrijao na temperaturu tela životinje pošto se pripremljen rastvor čuvao na temperaturi 4°C.



Slika 28. Goveđi laktoferin (Orig.)

#### 4.9. Određivanje koncentracije imunoglobulina G u mlečnom serumu krava

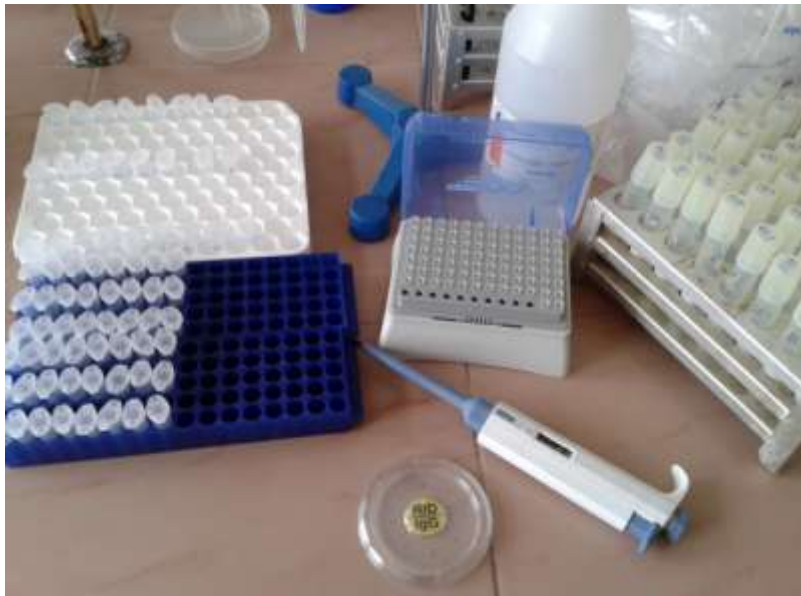
Određivanje koncentracije imunoglobulina G u mlečnom serumu krava urađeno je u laboratoriji za higijenu namirnica animalnog porekla na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu metodom radioimunodifuzijom (RID). Radioimunodifuzija je standardna metoda za određivanje koncentracije imunoglobulina u mlečnom i krvnom serumu. Za određivanje koncentracije imunoglobulina u mlečnom serumu korišćene su RID ploče proizvođača *INEP, Zemun*. U RID pločama nalazi se monospecifičan antiserum protiv goveđeg IgG.

Postupak određivanja koncentracije imunoglobulina G u mlečnom serumu je rađeno na osnovu uputstva proizvođača. Pre postupka, mlečni serum su stavljeni na

sobnu temperaturu da bi se otopili i zagrijali na sobnu temperaturu. Svaki serum se nakon toga stavio u električnu mućkalicu (*vortex*) kako bi se homogenizovao. Za pravljenje razređenja seruma korišćene su staklene epruvete zapremine 2 mL, gde se u svaku dodalo 0,9 mL fiziološkog rastvora i 0,1 mL seruma kako bi se dobilo odgovarajuće razređenje od 1/10. Nakon pravljenja razređenja, svaka epruveta je stavljena u električnu mućkalicu da bi se rastvor homogenizovao. Pomoću mikropipete uzeto je 5  $\mu$ L razređenja seruma koja se ukapala u bazenčice na RID pločama (Slika 29). Ploče su ostavljene u horizontalnom položaju na inkubaciju na sobnoj temperaturi 48 sati, i po isteku vremena se pristupilo očitavanju rezultata. Očitavanje se izvršilo merenjem prečnika precipitinskog kruga pomoću RID metra sa preciznošću od 0,1 mm (Slika 30). Određivanje koncentracije imunoglobulina G u mlečnom serumu krava, izvršena je prema tablici koju daje proizvođač (Prilog 5). Ako se dobijene vrednosti nisu podudarale sa vrednostima iz tablice proizvođača, iste su se preračunavale pomoću formule za izračunavanje koncentracije imunoglobulina G, i to:

$$C = ((R^2 - b) / a) \times 10$$

gde je „R“ - prečnik precipitinskog prstena; „b“ - konstanta vrednosti 8,69; „a“ - konstanta vrednosti 47,48.



**Slika 29.** Određivanje koncentracije IgG pomoću RID ploča (Orig.)



**Slika 30.** Izgled RID ploče nakon inkubacije i pojave precipitinskih prstenova (Orig.)

#### **4.10. Određivanje koncentracije laktoferina u mlečnom serumu krava**

Određivanje koncentracije laktoferina u mlečnom serumu krava urađeno je u laboratoriji za serologiju Naučnog instituta za veterinarstvo „Novi Sad“ u Novom Sadu, primenom ELISA testa proizvođača *Bethyl Laboratories, Inc., USA*. Pri ispitivanju koristio se *Bovine Lactoferrin ELISA Quantitation Set* koji sadrži komponentne za testiranje 1 000 pojedinačnih uzoraka. Pored detekcije koncentracije laktoferina u mleku i kolostrumu, pogodan je i za određivanje koncentracije laktoferina u drugim biološkim uzorcima kao što su krvna plazma, urin, saliva i suze.

##### **4.10.1. Oprema i reagensi**

*Bovine Lactoferrin ELISA Quantitation Set* sadrži sledeće komponente:

- Prečišćena anti-goveđi laktoferin ovčija antitela za oblaganje (*Goat anti-Bovine Lactoferrin Coating Antibody*), 1 mL
- Goveđi laktoferin kalibrator (*Bovine Lactoferrin Calibrator*), 0,1 mL
- HRP konjugovana anti-goveđi laktoferin ovčija antitela za detekciju (*HRP Conjugated Goat anti-Bovine Lactoferrin Detection Antibody*), 0,1 mL



Pored navedenih komponenti, neophodno je bilo i sledeće:

- Mikrotitar ploče sa 96 bazenčića
- ELISA pufer za oblaganje bazenčića (*ELISA Coating Buffer*)
- Pufer za blokiranje reakcije (*Blocking Buffer*)
- Rastvarač za uzorak/konjugat (*Sample/Conjugate Diluent*)
- Rastvor za ispiranje ELISA reakcije (*ELISA Wash Solution*)
- Enzimski supstrat, TBA
- Rastvor za zaustavljanje ELISA reakcije (*ELISA Stop Solution*)

*ELISA Starter Accessory Kit II* sadrži sve navedene komponente sem ELISA stop rastvora.

Dodatna oprema koja je bila potrebna za izvođenje testa:

- Dejonizovana voda
- Mikropipete sa jednokratnim nastavcima
- Staklene epruvete za pripremanje standarda i uzoraka
- Erlenmajeri za pripremu rastvora
- Uređaj za ispiranje mikrotitar ploča
- Jednokratni rezervoari reagensa
- Čitač mikrotitar ploča koji meri apsorbancu na 450 nm

#### **4.10.2. Pufer za blokiranje reakcije, rastvarač za uzorak/konjugat i rastvor za ispiranje ELISA reakcije**

Pufer za blokiranje reakcije, rastvarač za uzorak/konjugat i rastvor za ispiranje ELISA reakcije su bili identični i predstavljaju 50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 0,05% Tween 20, pH 8,0.

#### 4.10.2.1. Priprema pufera

*ELISA Starter Accessory Kit* je sadržavao *Tris Buffer Saline* sa *Tween 20*, pH 8, u vidu praha koji se morao rastvoriti u 1 L dejonizovane vode. Pripremljen rastvor se može čuvati na temperaturi od 2°C do 30°C do godinu dana.

#### 4.10.3. Oblaganje (*coating*) i blokiranje (*blocking*) mikrotitar ploča

Pre pristupanju postupku oblaganja mikrotitar ploča, neophodno je bilo pripremiti ELISA pufer za oblaganje bazenčića mikrotitar ploče. Pufer za oblaganje dolazi u vidu kapsule čiji se sadržaj morao rastvoriti u 100 mL dejonizovane vode i predstavlja 0,05 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,6. Pufer se može čuvati na sobnoj temperaturi do godinu dana.

##### 4.10.3.1. Postupak rada

Za oblaganje svakog bazenčića mikrotitar ploče bilo je potrebno razblažiti 1 µL prečišćenih antitela u 100 µL ELISA pufera za oblaganje, što znači, za oblaganje jedne cele ploče neophodno je bilo razblažiti 102 µL antitela u 10,2 mL pufera. Po 100 µL razblaženih antitela je pipetirano u svaki bazenčić mikrotitar ploče i takva ploča je prekrivena i ostavljena na sobnoj temperaturi (20 - 25°C) 60 minuta da se inkubira. Posle inkubacije, rastvor antitela je odstranjen aspiracijom i mikrotitar ploča je isprana pet puta sa rastvorom za ispiranje ELISA reakcije (*ELISA Wash Solution*).

U svaki bazenčić pipetirano je 200 µL rastvora za blokiranje (*ELISA Blocking Solution*). Blokiranje ploče su inkubirane na sobnoj temperaturi (20 - 25°C) u trajanju od 30 minuta. Ovako pripremljena ploča se odmah koristila za testiranje uzoraka, iako se ista može koristiti u narednih 24 sata, pri čemu se mora pokriti i ostaviti na temperaturi od 2°C do 8°C. U tom slučaju, rastvor za blokiranje ostaje u bazenčićima.

Nakon inkubacije od pola sata, rastvor za blokiranje je odstranjen iz mikrotitar ploče i ploča je isprana pet puta sa rastvorom za ispiranje ELISA reakcije.

#### 4.10.4. Priprema uzoraka i standarda za ELISA test

Uzorci mlečnog seruma krava su odmrznuti na temperaturi od 4°C do 8°C, homogenizovani na *vortex* mešalici i potom razređeni u odnosu 1:10 000, odnosno 0,5 µL uzorka je razređeno u 5 mL uzorak/konjugat rastvaraču (Newman i sar., 2009).

Standardi su pripremljeni po sledećem postupku:

Inicijalno razređenje (standard 1) od 500 ng/mL se dobilo razblaženjem 5 µL goveđeg laktoferin kalibratora u 10 mL uzorak/konjugat rastvaraču. Potom je sledila serija razblaženja 500 ng/mL standarda sa uzorak/konjugat rastvaračem (1:1). Razblaženje se izvelo mešanjem 500 µL prethodnog standarda sa 500 µL uzorak/konjugat rastvaračem (Tabela 11). Ukupno je bilo sedam standarda: 500 ng/mL, 250 ng/mL, 125 ng/mL, 62,5 ng/mL, 31,25 ng/mL, 15,625 ng/mL i 7,8 ng/mL.

**Tabela 11.** Priprema standarda za ELISA test

Standard	ng/mL	Bovine Lactoferrin Calibrator	Uzorak razblaženja
1	500	5 µL	10 mL
2	250	500 µL od Standarda 1	500 µL
3	125	500 µL od Standarda 2	500 µL
4	62,5	500 µL od Standarda 3	500 µL
5	31,25	500 µL od Standarda 4	500 µL
6	15,625	500 µL od Standarda 5	500 µL
7	7,8	500 µL od Standarda 6	500 µL
8	0	Blank	500 µL

Po 100 µL ovako pripremljenih standarda i uzoraka, pipetirano je u bazenčice mikrotitar ploče. Tokom ovog postupka, vodio se evidencioni list ploče kako bi se znalo koji bazenčić ploče kom standardu i uzorku pripada. Mikrotitar ploča je potom inkubirana na sobnoj temperaturi (22°C) u trajanju od 60 minuta. Posle inkubacije, standardi i uzorci su uklonjeni i ploča je isprana pet puta sa rastvorom za ispiranje ELISA reakcije.

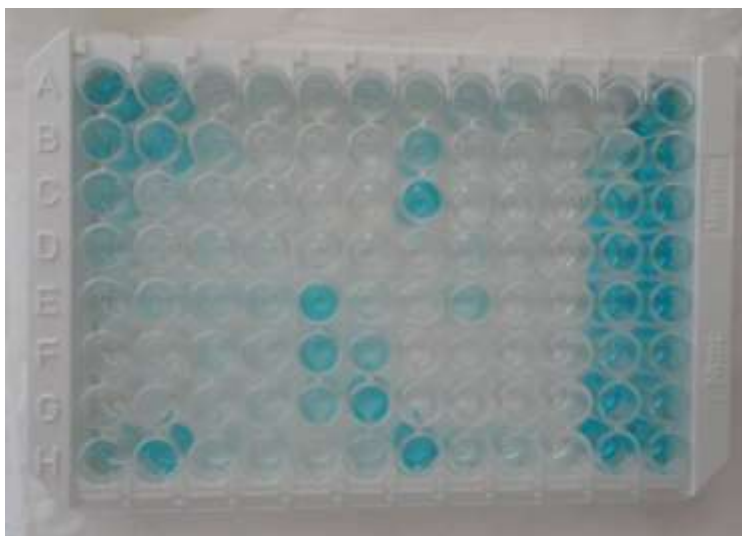
#### 4.10.5. Dodavanje konjugata, supstrata, stop rastvora i merenje apsorbance

HRP antitela za detekciju trebalo je razblažiti u uzorak/konjugat rastvaraču, pri čemu je preporučeno početno razređenje 1:200 000, odnosno 1 µL HRP antitela za

detekciju je razblaženo u 200 mL uzorak/konjugat rastvaraču. U svaki bazenčić mikrotitar ploče pipetirano je po 100  $\mu\text{L}$  ovako razblaženog konjugata. Nakon dodavanja konjugata, ploča je inkubirana na temperaturi od 20°C do 25°C tokom 60 minuta. Posle inkubacije, konjugat je uklanjen iz ploče, te je vršeno njeno ispiranje sa rastvorom za ispiranje ELISA reakcije pet puta.

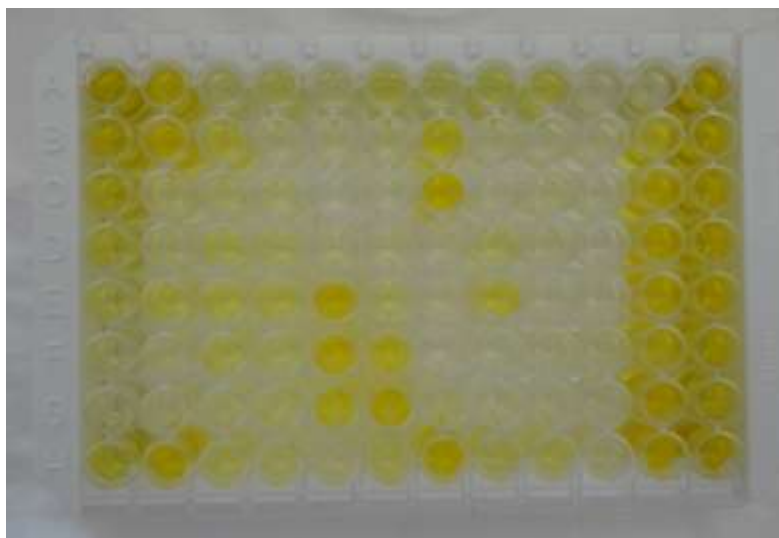
TMB supstrat, koji je uključen u *ELISA Starter Accessory Kit*, je spreman za korišćenje. Mora se voditi računa da se prilikom pipetiranja ne koriste staklene pipete, kao i da ne dođe do kontaminacije TMB supstrat rastvora. TMB supstrat je neupotrebljiv ako se preboji u plavu boju pre korišćenja.

U svaki bazenčić mikrotitar ploče je pipetirano po 100  $\mu\text{L}$  TMB supstrat rastvora (*TMB Substrate Solution*) i ploča je ostavljena na sobnoj temperaturi u mračnoj prostoriji 15 minuta kako bi se razvila enzimaska reakcija. Tokom ovog procesa, TMB supstrat rastvor je poprimio plavu boju (Slika 31).



**Slika 31.** Izgled mikrotitar ploče sa dodatim TMB supstratom (Orig.)

Posle isteka 15 minuta, reakcija se zaustavila dodavanjem 100  $\mu\text{L}$  ELISA stop rastvora (0,18 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Opreznim i nežnim tapkanjem je pomešan rastvor u ploči. Tokom ovog postupka, rastvor je u bazenčićima promenio boju iz plave u žutu (Slika 32).



**Slika 32.** Izgled mikrotitar ploče sa dodatim ELISA stop rastvorom (Orig.)

Za merenje apsorbance koristio se čitač mikrotitar ploče *Labsystems Multiskan®* MCC/340 podešen na 450 nm. Dobile vrednosti koncentracije laktoferina pomnožili su se sa faktorom razblaženja kako bi se dobila koncentracija goveđeg laktoferina u nerazblaženom uzorku.

#### **4.11. Statistična analiza podataka**

Za prikaz rezultata korišćena je deskriptivna statistika (minimalne i maksimalne vrednosti, aritmetička sredina i standardna devijacija), kao i test korelacije primenom statističkog programa IBM SPSS Statistics 20 (*IBM Corp. Armonk, NY, USA*).

## **5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA**

### **5.1. Identifikacija krava ogledne grupe I sa kliničkim i subkliničkim oblikom mastitisa**

#### **5.1.1. Klinički pregled vimena krava ogledne grupe I u periodu zasušenja**

Ukupno je pregledano 50 visokomlečnih krava u periodu zasušenja, pri čemu su promene na vimenu krava uočene kod devet životinja. Životinje sa izraženim znacima kliničkog mastitisa nisu uljučene u istraživanje, tako da ukupan broj životinja koje su ušle u eksperiment je 41. Nalaz kliničkog pregleda prikazan je u tabeli 12.

**Tabela 12.** Nalaz kliničkog pregleda vimena krava ogledne grupe I u periodu zasušenja

<b>Klinički pregled</b>	<b>Opis</b>	<b>Broj četvrti</b>	<b>%</b>
<b><u>Adspekcija vimena</u></b>	Povećano i asimetrično vime	0	0
	Smanjeno i asimetrično vime	3	2
	Opušteno vime	1	0,67
	Crvenilo	0	0
	Oštećenje kože vimena	0	0
<b><u>Adspekcija papile vimena</u></b>	Povećane i asimetrične papile	0	0
	Smanjene i asimetrične papile	2	1,33
	Oštećenje kože papile	2	1,33
	Povrede papile	5	3,33
	Akcesorne papile	4	2,67
<b><u>Palpacija vimena</u></b>	Temperiranost kože vimena	0	0
	Otok vimena	0	0
<b><u>Palpacija papile vimena</u></b>	Opstrukcija papile	3	2
<b>Ukupno pregledano</b>		150	100

Nefunkcionalne papile vimena primećene su kod 14 krava (trosise). Nefunkcionalne papile su najčešće bile prednja leva četvrt (6/14), dok su četiri četvrti bile prednja desna i zadnja leva (Tabela 13). Nije bilo zadnje desne nefunkcionalne četvrti vimena krava.

**Tabela 13.** Nefunkcionalne papile vimena krava ogledne grupe I u periodu zasušenja

<b>Četvrt vimena</b>	<b>Broj četvrti</b>	<b>%</b>
Prednja desna	4	28,57
Prednja leva	6	42,86
Zadnja desna	/	/
Zadnja leva	4	28,57
<b>Ukupno</b>	14	100

### 5.1.2. Bakteriološki nalaz mleka krava ogledne grupe I u periodu zasušenja

Tokom perioda zasušenja, bakteriološki je obrađeno ukupno 150 pojedinačnih uzoraka mleka iz četvrti vimena krava. Bakterije nisu izolovane kod 76 (50,67%) uzoraka mleka, dok je pozitivan bakteriološki nalaz zabeležen kod 74 (49,33%) uzorka. Bakteriološki nalaz uzoraka mleka krava u periodu zasušenja prikazan je u tabeli 14.

**Tabela 14.** Bakteriološki nalaz uzoraka mleka krava ogledne grupe I u periodu zasušenja

<b>Bakteriološki nalaz</b>	<b>Broj uzorka</b>	<b>%</b>
Bez rasta bakterija	76	50,67
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	2
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3	2
Patogeni iz okruženja	3	2
<i>Corynebacterium</i> spp.	49	32,67
Koagulaza negativne stafilokoke	7	4,66
Ostali mikroorganizmi*	9	6
<b>Ukupno</b>	<b>150</b>	<b>100</b>

\* više vrsta bakterija, gljivice i plesni

Iz uzoraka mleka krava najčešće su izolovane bakterije *Corynebacterium* spp. (32,67%) i koagulaza negativne stafilokoke (4,66%). Kontagiozni patogeni identifikovani su u šest uzoraka mleka, odnosno u šest četvrti vimena, i to u tri uzorka mleka *Staphylococcus aureus* i u tri uzorka *Streptococcus agalactiae*.

Kod životinja sa pozitivnim bakteriološkim nalazom (74/150) primenila se antibiotska terapija u periodu zasušenja mlečne žlezde.

### **5.1.3. Klinički pregled vimena krava ogledne grupe I u periodu rane laktacije**

U periodu rane laktacije, urađen je kontrolni klinički pregled krava kod kojih se tokom perioda zasušenja primenila terapija antimikrobnim lekovima. Ukupno je pregledano 21 krava, odnosno 74 četvrti vimena. Nalaz kliničkog pregleda u periodu rane laktacije prikazan je u tabeli 15.



**Tabela 15.** Nalaz kliničkog pregleda vimena krava ogledne grupe I  
u periodu rane laktacije

<b>Klinički pregled</b>	<b>Opis</b>	<b>Broj četvrti</b>	<b>%</b>
<b><u>Adspekcija vimena</u></b>	Povećano i asimetrično vime	4	5,48
	Smanjeno i asimetrično vime	0	0
	Opušteno vime	3	4,11
	Crvenilo	4	5,48
	Oštećenje kože vimena	0	0
<b><u>Adspekcija papile vimena</u></b>	Povećane i asimetrične papile	2	2,74
	Smanjene i asimetrične papile	0	0
	Oštećenje kože papile	1	1,37
	Povrede papile	3	4,11
	Aksesorne papile	2	2,74
<b><u>Palpacija vimena</u></b>	Temperiranost kože vimena	3	4,11
	Otok vimena	2	2,74
<b><u>Palpacija papile vimena</u></b>	Opstukcija papile	1	1,37
<b>Ukupno pregledano</b>		<b>74</b>	<b>100</b>

#### 5.1.4. Bakteriološki nalaz mleka krava ogledne grupe I u periodu rane laktacije

Tokom perioda rane laktacije, bakteriološki je obrađeno ukupno 74 uzorak mleka iz pojedinačnih četvrti vimena. Bakterije nisu izolovane kod 39 (52,7%) uzoraka, dok je pozitivan bakteriološki nalaz zabeležen kod 35 (47,3%) uzorka. Bakteriološki nalaz uzoraka mleka krava u periodu rane laktacije dat je u tabeli 16.

**Tabela 16.** Bakteriološki nalaz uzoraka mleka krava ogledne grupe I  
u periodu rane laktacije

<b>Bakteriološki nalaz</b>	<b>Broj uzorka</b>	<b>%</b>
Bez rasta bakterija	39	52,7
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	1,35
Patogeni iz okruženja	3	4,06
<i>Corynebacterium</i> spp.	30	40,54
Koagulaza negativne stafilokoke	1	1,35
<b>Ukupno</b>	<b>74</b>	<b>100</b>

Najčešće izolovana bakterija u periodu rane laktacije je *Corynebacterium* spp. (40,54%), dok su kontagiozni patogeni identifikovani u jednom uzorku mleka (1,35%).

## 5.2. Identifikacija krava ogledne grupe II sa kliničkim i subkliničkim oblikom mastitisa

### 5.2.1. Klinički pregled vimena krava ogledne grupe II u periodu predzasušnja

Ukupno je pregledano 20 visokomlečnih krava u periodu predzasušnja, pri čemu su promene na vimenu krava uočene kod pet životinja. Životinje sa izraženim znacima kliničkog mastitisa nisu uljučene u istraživanje, tako da ukupan broj krava koje su ušle u eksperiment je 15. Nalaz kliničkog pregleda prikazan je u tabeli 17.

**Tabela 17.** Nalaz kliničkog pregleda vimena krava ogledne grupe II u periodu predzasušnja

Klinički pregled	Opis	Broj četvrti	%
<b><u>Adspekcija vimena</u></b>	Povećano i asimetrično vime	0	0
	Smanjeno i asimetrično vime	2	3,64
	Opušteno vime	0	0
	Crvenilo	0	0
	Oštećenje kože vimena	1	1,82
<b><u>Adspekcija papile vimena</u></b>	Povećane i asimetrične papile	0	0
	Smanjene i asimetrične papile	2	3,64
	Oštećenje kože papile	2	3,64
	Povrede papile	3	5,45
	Akcesorne papile	0	0
<b><u>Palpacija vimena</u></b>	Temperiranost kože vimena	0	0
	Otok vimena	0	0
<b><u>Palpacija papile vimena</u></b>	Opstukcija papile	1	1,82
<b>Ukupno pregledano</b>		55	100

Nefunkcionalne papile vimena primećene su kod tri krave, pri čemu je jedna krava bila trosisa, a ostale dvosise. Nefunkcionalne papile su najčešće bile prednja leva četvrt (6/14), dok su četiri četvrti bile prednja desna i zadnja leva (Tabela 18). Nije bilo zadnje desne nefunkcionalne četvrti vimena krava.

**Tabela 18.** Nefunkcionalne papile vimena krava ogledne grupe II u periodu predzasušnja

Četvrt vimena	Broj četvrti	%
Prednja desna	/	/
Prednja leva	1	20
Zadnja desna	2	40
Zadnja leva	2	40
<b>Ukupno</b>	<b>5</b>	<b>100</b>

### 5.2.2. Bakteriološki nalaz mleka krava ogledne grupe II u periodu predzasušnja

Tokom perioda predzasušnja, bakteriološki je obrađeno ukupno 55 pojedinačnih uzoraka mleka iz četvrti vimena krava. Bakterije nisu izolovane kod 15 (27,27%) uzoraka mleka, dok je pozitivan bakteriološki nalaz zabeležen kod 40 (72,73%) uzorka. Bakteriološki nalaz uzoraka mleka krava u periodu zasušnja prikazan je u tabeli 19.

**Tabela 19.** Bakteriološki nalaz uzoraka mleka krava ogledne grupe II u periodu predzasušnja

Bakteriološki nalaz	Broj uzorka	%
Bez rasta bakterija	15	27,27
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	9,09
Patogeni iz okruženja	3	5,45
<i>Corynebacterium</i> spp.	19	34,55
Koagulaza negativne stafilokoke	13	23,64
<b>Ukupno</b>	<b>55</b>	<b>100</b>

Iz uzoraka mleka krava najčešće su izolovane bakterije *Corynebacterium* spp. (34,55%) i koagulaza negativne stafilokoke (23,64%). *Major* mastitis patogeni identifikovani su u osam uzoraka mleka, pri čemu je *Staphylococcus aureus* izolovan iz pet pojedinačna uzorka (9,09%).

Kod životinja sa pozitivnim bakteriološkim nalazom (40/55) primenila se terapija antibioticima i goveđim laktoferinom u periodu zasušnja mlečne žlezde.

### 5.2.3. Klinički pregled vimena krava ogledne grupe II u periodu rane laktacije

U periodu rane laktacije, urađen je kontrolni pregled krava sa pozitivnim bakteriološkim nalazom tokom perioda predzasušnja kod kojih se primenila terapija antimikrobnim lekovima i goveđim laktoferinom. Pregledano je ukupno 40 četvrti vimena krava. Nalaz kliničkog pregleda vimena krava ogledne grupe II u periodu rane laktacije prikazan je u tabeli 20.

**Tabela 20.** Nalaz kliničkog pregleda vimena krava ogledne grupe II u periodu rane laktacije

Klinički pregled	Opis	Broj četvrti	%
<b><u>Adspekcija vimena</u></b>	Povećano i asimetrično vime	2	5
	Smanjeno i asimetrično vime	0	0
	Opušteno vime		
	Crvenilo	4	10
	Oštećenje kože vimena	0	0
<b><u>Adspekcija papile vimena</u></b>	Povećane i asimetrične papile	4	10
	Smanjene i asimetrične papile	0	0
	Oštećenje kože papile	1	2,5
	Povrede papile	0	0
	Akcesorne papile	0	0
<b><u>Palpacija vimena</u></b>	Temperiranost kože vimena	3	7,5
	Otok vimena	2	5
<b><u>Palpacija papile vimena</u></b>	Opstukcija papile	0	0
<b>Ukupno pregledano</b>		40	100

### 5.2.4. Bakteriološki nalaz mleka krava ogledne grupe II u periodu rane laktacije

Tokom perioda rane laktacije, bakteriološki je obrađeno ukupno 40 uzorak mleka krava iz pojedinačnih četvrti vimena. Bakterije nisu izolovane kod 24 (60%) uzoraka, dok je pozitivan bakteriološki nalaz zabeležen kod 16 (40%) uzorka. Bakteriološki nalaz uzoraka mleka krava u periodu rane laktacije dat je u tabeli 21.

**Tabela 21.** Bakteriološki nalaz uzoraka mleka krava ogledne grupe II  
u periodu rane laktacije

<b>Bakteriološki nalaz</b>	<b>Broj uzorka</b>	<b>%</b>
Bez rasta bakterija	24	60
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	5
Patogeni iz okruženja	2	5
<i>Corynebacterium</i> spp.	7	17,5
Koagulaza negativne stafilokoke	5	12,5
<b>Ukupno</b>	<b>40</b>	<b>100</b>

Najčešće izolovane bakterije u periodu rane laktacije kod krava ogledne grupe II su *Corynebacterium* spp. (17,5%) i koagulaza negativne stafilokoke (12,5%), dok su kontagiozni patogeni identifikovani u dva uzorka mleka (5%).

### **5.3. Efikasnost primenjene terapije tokom perioda zasušenja kod krava ogledne grupe I i II**

Efikasnost primenjene terapije tokom perioda zasušenja sa antimikrobnim lekovima kod krava ogledne grupe I i sa antimikrobnim lekovima i goveđim laktoferinom kod krava ogledne grupe II prikazana je u tabeli 22. Procenat izlečenja kod krava ogledne grupe I iznosio je 52,7%, dok je kod ogledne grupe II uočena veća efikasnost primenjene terapije, pri čemu je ona iznosila 60%.

**Tabela 22.** Efikasnost primenjene terapije tokom perioda zasušenja

Bakteriološki nalaz	Period zasušenja	Period rane laktacije	
	broj uzorka	broj uzorka	
<b>Ogledna grupa I</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	/	
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	
	Patogeni iz okruženja	3	
	<i>Corynebacterium</i> spp.	30	
	Koagulaza negativne stafilokoke	1	
	Ostali mikroorganizmi*	/	
	Broj bakteriološki pozitivnih uzoraka	<b>74 (100%)</b>	<b>35 (47,3%)</b>
	Broj bakteriološki negativnih uzoraka		<b>39 (52,7%)</b>
<b>Ogledna grupa II</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	2	
	Patogeni iz okruženja	2	
	<i>Corynebacterium</i> spp.	7	
	Koagulaza negativne stafilokoke	5	
	Broj bakteriološki pozitivnih uzoraka	<b>40 (100%)</b>	<b>16 (40%)</b>
	Broj bakteriološki negativnih uzoraka		<b>24 (60%)</b>

\* više vrsta bakterija, gljivice i plesni

#### 5.4. Brzi testovi za identifikaciju krava sa poremećenom sekrecijom vimena

##### 5.4.1. Električna otpornost mleka krava ogledne grupe I u periodu zasušenja

Električna otpornost mleka krava ogledne grupe I u periodu zasušenja prikazana je u tabeli 23. Rezultat nalaza ukazuje na povećanje incidence subkliničkog mastitisa (72%), dok kod 28% uzorka Draminski mastitis test nije ukazao na postojanje poremećene sekrecije vimena.

**Tabela 23.** Električna otpornost mleka krava ogledne grupe I u periodu zasušenja

Električna otpornost	Broj uzorka	%
Iznad 300 jedinica	42	28
Između 250 i 300 jedinica	47	31,33
Ispod 250 jedinica	61	40,67

<b>Ukupno</b>	<b>150</b>	<b>100</b>
---------------	------------	------------

Električna otpornost i bakteriološki nalaz uzoraka mleka krava ogledne grupe I u periodu involucije dati su u tabeli 24.

**Tabela 24.** Električna otpornost mleka krava ogledne grupe I u periodu zasušenja sa bakteriološkim nalazom

Bakteriološki nalaz	Broj uzorka	Električna otpornost		
		I	II	III
Bez rasta bakterija	76	23	23	30
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	1	/	2
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3	/	1	2
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2	/	1	1
<i>Enterococcus faecium</i>	1	/	1	/
<i>Corynebacterium</i> spp.	49	11	16	22
Koagulaza negativne stafilokoke	7	3	1	3
Ostali mikroorganizmi*	9	4	1	4
<b>Ukupno</b>	<b>150</b>	<b>42</b>	<b>44</b>	<b>64</b>

\* više vrsta bakterija, gljivice i plesni

I- Iznad 300 jedinica

II- Između 250 i 300 jedinica

III- ispod 250 jedinica

Draminski mastitis detektor je ukazao na smanjenu električnu otpornost mleka kod 53 uzoraka mleka gde nije uočen rast bakterija. Bakterije su izolovane iz 74 uzoraka mleka, dok je Draminski mastitis test imao negativan nalaz kod uzorka mleka koji potiču iz 19 (25,68%) latentno inficiranih četvrti vimena krava.

U tabeli 25 prikazana je minimalna, maksimalna i prosečna vrednost električne otpornosti mleka.

**Tabela 25.** Minimalna, maksimalna i srednja vrednost električne otpornosti mleka krava ogledne grupe I u periodu zasušenja

Bakteriološki nalaz	Električna otpornost		
	Minimalna vrednost	Maksimalna vrednost	Srednja vrednost±SD
Bez rasta bakterija	170	520	275,79±74,18
<i>Staphylococcus aureus</i>	230	310	256,67±46,19
<i>Streptococcus agalactiae</i>	240	260	246,67±11,55
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	190	270	230±56,57
<i>Enterococcus faecium</i>	250	250	250
<i>Corynebacterium</i> spp.	170	410	263,27±54,79
Koagulaza negativne stafilokoke	220	320	275,71±46,5
Ostali mikroorganizmi*	220	500	340±97,47

\* više vrsta bakterija, gljivice i plesni

Najmanja prosečna vrednost električne otpornosti mleka zabeležena je kod uzoraka gde je izolovana bakterija *Streptococcus dysgalactiae* i iznosila je 230±56,57. Uzorci mleka iz kojih su izolovane više vrsta bakterija, gljivice i plesni imale su najveću prosečnu vrednost električne otpornosti mleka (340±97,47).

#### 5.4.2. Električna otpornost mleka krava ogledne grupe I u periodu rane laktacije

Električna otpornost mleka krava ogledne grupe I u periodu rane laktacije prikazana je u tabeli 26. Rezultati pregleda mleka iz četvrti vimena krava sa Draminski testom bili su negativni kod 94,6% uzoraka, dok je povećana električna provodljivost izmerena kod četiri uzorka mleka (5,4%). Električna otpornost mleka ispod 250 jedinica nije detektovana periodu rane laktacije.

**Tabela 26.** Električna otpornost mleka krava ogledne grupe I u periodu rane laktacije

Električna otpornost	Broj uzorka	%
Iznad 300 jedinica	70	94,6
Između 250 i 300 jedinica	4	5,4
Ispod 250 jedinica	/	/
<b>Ukupno</b>	<b>74</b>	<b>100</b>



Električna otpornost i bakteriološki nalaz uzoraka mleka krava ogledne grupe I u periodu rane laktacije dati su u tabeli 27.

**Tabela 27.** Električna otpornost mleka krava ogledne grupe I u periodu rane laktacije sa bakteriološkim nalazom

Bakteriološki nalaz	Broj uzorka	Električna otpornost		
		I	II	III
Bez rasta bakterija	39	36	3	/
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	1	/	/
<i>Bacillus</i> spp.	2	2	/	/
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	1	1	/	/
<i>Corynebacterium</i> spp.	30	29	1	/
Koagulaza negativne stafilokoke	1	1	/	/
<b>Ukupno</b>	<b>74</b>	<b>70</b>	<b>4</b>	<b>/</b>

I- Iznad 300 jedinica

II- Između 250 i 300 jedinica

III- ispod 250 jedinica

Draminski mastitis test dao je negativan rezultat kod 34 bakteriološki pozitivnih uzoraka mleka, dok je Draminski test ukazao kod tri bakteriološki negativnih uzoraka na povećanu električnu provodljivost. Samo četiri uzoraka mleka imali su vrednost električne otpornosti između 250 i 300 jedinica što može ukazati na mogućnost pojave subkliničkog mastitisa.

U tabeli 28 prikazana je minimalna, maksimalna i prosečna vrednosti električne otpornosti mleka.

**Tabela 28.** Minimalna, maksimalna i srednja vrednost električne otpornosti mleka krava ogledne grupe I u periodu rane laktacije

Bakteriološki nalaz	Električna otpornost		
	Minimalna vrednost	Maksimalna vrednost	Srednja vrednost±SD
Bez rasta bakterija	260	700	402,63±73,51
<i>Streptococcus agalactiae</i>	450	450	450
<i>Bacillus</i> spp.	430	430	430
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	330	330	330
<i>Corynebacterium</i> spp.	270	470	403,67±40,56
Koagulaza negativne stafilokoke	360	360	360

Najmanja i najveća vrednost električne otpornosti mleka zabeležena je kod uzoraka mleka gde nije uočen rast bakterija. Prosečne vrednosti električne otpornosti mleka dobijeni Draminski detektorom ukazuju na odsustvo poremećene sekrecije u periodu rane laktacije.

#### 5.4.3. Ispitivanje senzitivnosti i specifičnosti Draminski mastitis testa

U tabeli 29 prikazana je senzitivnost i specifičnost Draminski mastitis detektora tokom perioda zasušenja i rane laktacije. Tokom perioda zasušenja, senzitivnost Draminski mastitis testa je iznosila 74,32%, dok je specifičnost iznosila 30,26%, dok je tokom perioda rane laktacije uočena izrazito mala senzitivnost (2,86%), a velika specifičnost (92,31%).

**Tabela 29.** Senzitivnost i specifičnost Draminski mastitis detektora

Karakteristike	Draminski mastitis test			
	Period zasušenja		Period rane laktacije	
	Broj uzorka	%	Broj uzorka	%
Pozitivno	55	74,32	1	25
Lažno pozitivno	19	25,68	3	75
Negativno	23	30,26	36	51,43
Lažno negativno	53	69,74	34	48,57
Senzitivnost (%)	74,32		2,86	
Specifičnost (%)	30,26		92,31	
Validnost (%)	52		48,65	

#### 5.4.4. Rezultati Kalifornija mastitis testa kod krava ogledne grupe II tokom perioda predzasušnja

Na farmi krava ukupno je pregledano Kalifornija mastitis testom 55 pojedinačna uzorka mleka u cilju identifikacije poremećene sekrecije vimena. Poremećena sekrecija vimena identifikovana je u 32 (58,18%) četvrti vimena krava, dok je negativan nalaz zabeležen kod 23 (41,82%) četvrti (Tabela 30).

**Tabela 30.** Reakcija Kalifornija mastitis testa sa bakteriološkim nalazom uzoraka mleka krava ogledne grupe II u periodu predzasušnja

Bakteriološki nalaz	Broj uzorka	Kalifornija mastitis test	
		Negativna reakcija	Pozitivna reakcija
Bez rasta bakterija	15	13	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	2	3
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	3	/	3
<i>Corynebacterium</i> spp.	19	6	13
Koagulaza negativne stafilokoke	13	2	11
<b>Ukupno</b>	<b>55</b>	<b>23</b>	<b>32</b>

Prema Kalifornija mastitis testu, poremećena sekrecija vimena uočena je u dve četvrti vimena, gde bakteriološkom analizom mleka u tih četvrti nije uočen rast bakterija. Kod deset bakteriološki pozitivnih uzoraka mleka Kalifornija mastitis test je dao negativnu reakciju.

#### 5.4.5. Rezultati Kalifornija mastitis testa kod krava ogledne grupe II tokom perioda rane laktacije

Poremećena sekrecija vimena krava ogledne grupe II u periodu rane laktacije identifikovana je u 22 (55%) četvrti vimena od ukupno pregledanih 40 (100%). Rezultat Kalifornija mastitis testa prikazana je u tabeli 31.

**Tabela 31.** Reakcija Kalifornija mastitis testa sa bakteriološkim nalazom uzoraka mleka krava ogledne grupe II u periodu rane laktacije

Bakteriološki nalaz	Broj uzorka	Kalifornija mastitis test	
		Negativna reakcija	Pozitivna reakcija
Bez rasta bakterija	24	19	5
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	/	2
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	2	/	2
<i>Corynebacterium</i> spp.	7	1	6
Koagulaza negativne stafilokoke	5	1	4
<b>Ukupno</b>	<b>40</b>	<b>21</b>	<b>19</b>

Prema Kalifornija mastitis testu, poremećena sekrecija vimena uočena je kod pet četvrti vimena gde bakteriološkom analizom mleka u tih četvrti nije uočen rast bakterija. Kalifornija mastitis test je dao negativnu reakciju kod dva bakteriološki pozitivnih uzoraka mleka.

#### 5.4.6. Ispitivanje senzitivnosti i specifičnosti Kalifornija mastitis testa

U tabeli 32 prikazana je senzitivnost i specifičnost Kalifornija mastitis testa. Tokom perioda predzasušavanja, senzitivnost i specifičnost testa su iznosili 80%, dok su tokom perioda rane laktacije vrednosti bile više i iznosile 87,5%.

**Tabela 32.** Senzitivnost i specifičnost Kalifornija mastitis testa

Karakteristike	Kalifornija mastitis test			
	Period predzasušavanja		Period rane laktacije	
	Broj uzorka	%	Broj uzorka	%
Pozitivno	30	93,75	14	82,35
Lažno pozitivno	2	6,25	3	17,65
Negativno	13	56,52	21	91,3
Lažno negativno	10	43,48	2	8,7
Senzitivnost (%)	75		87,5	
Specifičnost (%)	86,67		87,5	
Validnost (%)	78,18		87,5	

## 5.5. Vrednosti broja somatskih ćelija u zbirnim uzorcima mleka krava

### 5.5.1. Vrednosti broja somatskih ćelija u zbirnim uzorcima mleka krava ogledne grupe I u periodu zasušenja

Tokom perioda zasušenja, uzimani su zbirni uzorci mleka radi određivanja broja somatskih ćelija. Ukupno je obrađeno 41 zbirna uzorka mleka krava ogledne grupe I u periodu zasušenja, pri čemu je prosečna vrednost broja somatskih ćelija iznosila  $632,47 \pm 253,28$  ( $\times 10^3$ ) (Tabela 33).

**Tabela 33.** Broj somatskih ćelija u zbirnim uzorcima mleka krava ogledne grupe I tokom perioda zasušenja

	Broj uzorka	Minimalna vrednost	Maksimalna vrednost	Srednja vrednost $\pm$ SD
Broj somatskih ćelija $\times 10^3$	41	89	905	632,47 $\pm$ 253,28

### 5.5.2. Vrednosti broja somatskih ćelija u zbirnim uzorcima mleka krava ogledne grupe I u periodu rane laktacije

Tokom perioda rane laktacije, ukupno je obrađeno 21 zbirna uzorka mleka za određivanje broja somatskih ćelija. Prosečna vrednost broja somatskih ćelija u mleku krava ogledne grupe I u periodu rane laktacije iznosila je  $205,87 \pm 139,17$  ( $\times 10^3$ ) (Tabela 34).

**Tabela 34.** Broj somatskih ćelija u zbirnim uzorcima mleka ogledne grupe I tokom perioda rane laktacije

	Broj uzorka	Minimalna vrednost	Maksimalna vrednost	Srednja vrednost $\pm$ SD
Broj somatskih ćelija $\times 10^3$	21	58	472	205,87 $\pm$ 139,17

### 5.5.3. Vrednosti broja somatskih ćelija u zbirnim uzorcima mleka krava ogledne grupe II u periodu predzasušenja

Tokom perioda predzasušenja, uzimani su zbirni uzorci mleka radi određivanja broja somatskih ćelija. Ukupno je obrađeno 15 zbirna uzorka, pri čemu je prosečna

vrednost broja somatskih ćelija iznosila  $578,36 \pm 201,38$  ( $\times 10^3$ ). Rezultat je prikazan u tabeli 35.

**Tabela 35.** Broj somatskih ćelija u zbirnim uzorcima mleka krava ogledne grupe II tokom perioda predzasušnja

	Broj uzorka	Minimalna vrednost	Maksimalna vrednost	Srednja vrednost $\pm$ SD
<b>Broj somatskih ćelija <math>\times 10^3</math></b>	15	167	1267	578,36 $\pm$ 201,38

#### 5.5.4. Vrednosti broja somatskih ćelija u zbirnim uzorcima mleka krava ogledne grupe II u periodu rane laktacije

Tokom perioda rane laktacije, ukupno je obrađeno 11 zbirna uzorka mleka za određivanje broja somatskih ćelija. Prosečna vrednost broja somatskih ćelija u mleku krava ogledne grupe II u periodu rane laktacije iznosila je  $241,57 \pm 184,23$  ( $\times 10^3$ ) (Tabela 36).

**Tabela 36.** Broj somatskih ćelija u zbirnim uzorcima mleka ogledne grupe II tokom perioda rane laktacije

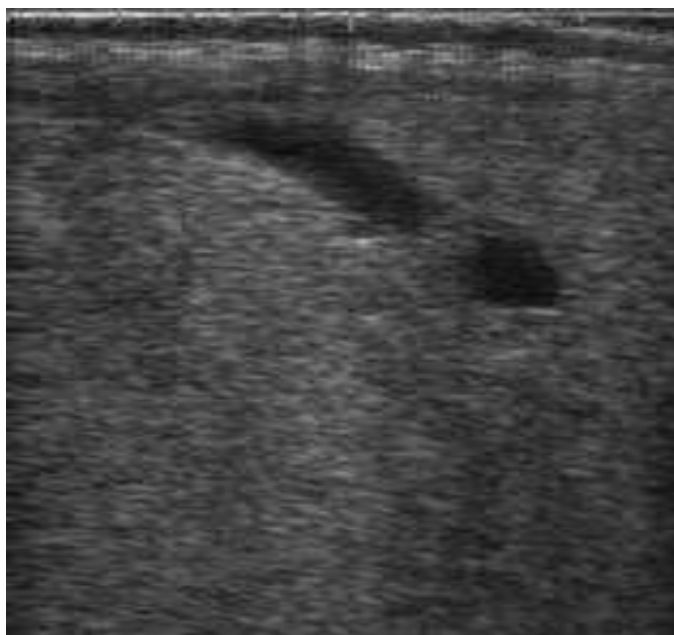
	Broj uzorka	Minimalna vrednost	Maksimalna vrednost	Srednja vrednost $\pm$ SD
<b>Broj somatskih ćelija <math>\times 10^3</math></b>	11	61	546	241,57 $\pm$ 184,23

#### 5.6. Ultrasonografija fiziološke i patološki promenjene mlečne žlezde krava

Ultrasonografija mlečne žlezde krava urađena je kod 14 životinja sa izraženim znacima kliničkog oblika mastitisa i kod 43 životinje kod kojih je subklinički mastitis potvrđen laboratorijskim metodama.

Promene koje su uočene ultrazvučnim pregledom mlečne žlezde krava (parenhima i papile vimena, kao i supramamarnih limfnih čvorova) klasifikovane su u sledeće grupe:

Grupa 1: Ultrazvučni nalaz fiziološkog parenhima i papile vimena. Parenhim vimena se uočava kao homogena struktura, ujednačene ehogenosti sa anehogenim poljima koji odgovaraju krvnim sudovima i kanalikularnom sistemu vimena (Slika 33), dok se kod papile jasno mogu diferencirati njene strukture - zid papile, sisna cisterna, sisni kanal i Firstenbergova rozeta (Slika 34).

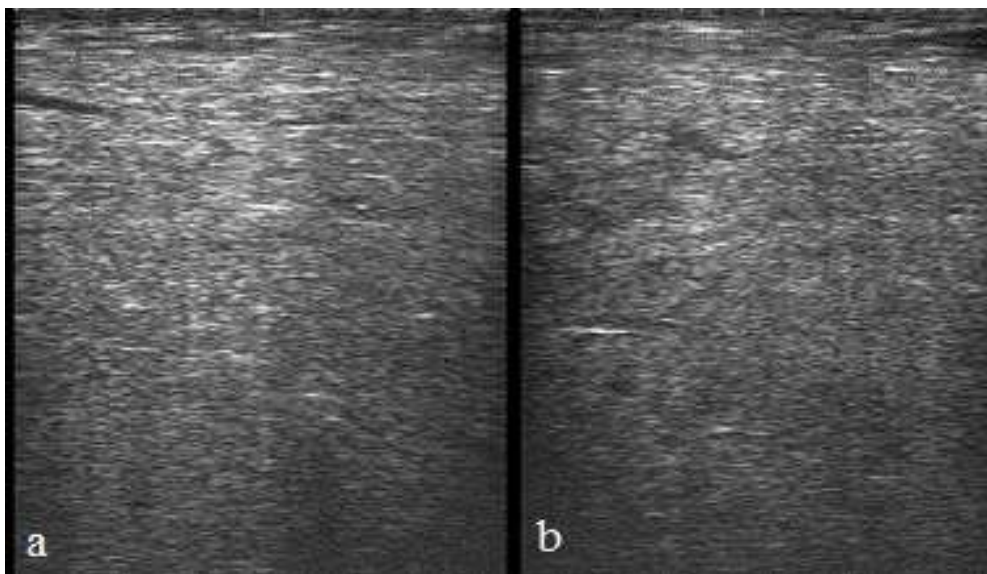


**Slika 33.** Ultrazvučni prikaz fiziološkog parenhima vimena krava (Orig.)



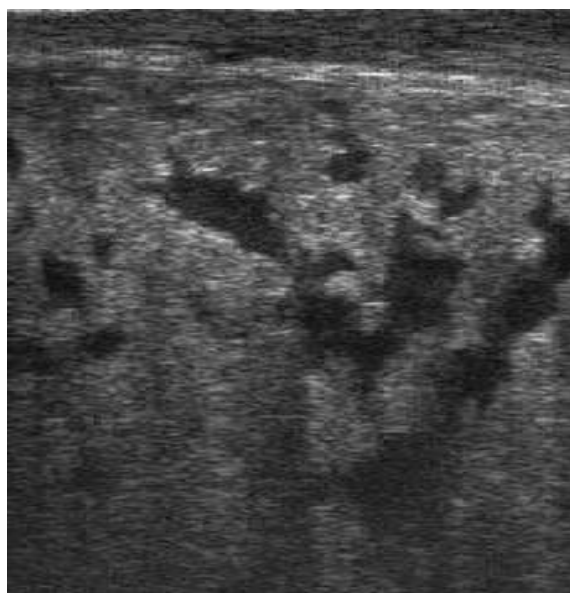
**Slika 34.** Ultrazvučni prikaz fiziološke papile vimena krava (Orig.)

Grupa 2: Ultrazvučni nalaz patološki promjenjenog parenhima vimena, pri čemu se parenhim vizualizuje kao nehomogena, hiperehogena struktura (Slika 35a i b).



**Slika 35a i b.** Ultrazvučni prikaz patološki promjenjenog parenhima vimena krava (Orig.)

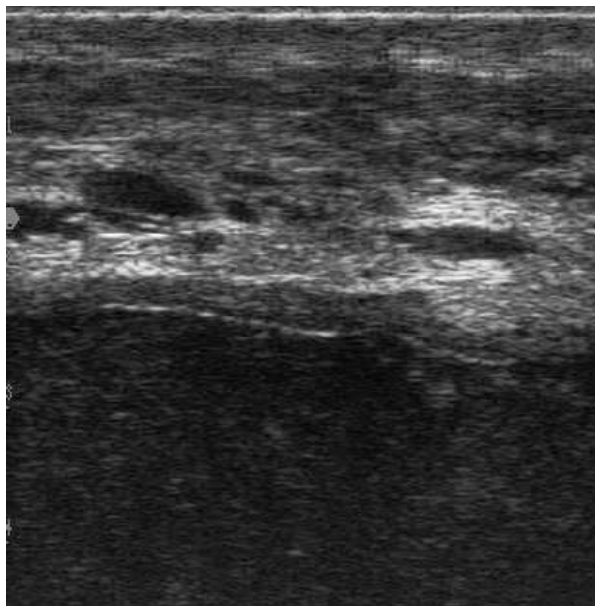
Grupa 3: Ultrazvučni nalaz patološki promjenjenog parenhima vimena. Struktura parenhima vimena je nehomogena sa nepravilnim anehogenim poljima koji ukazuju na mogućnost pojave edema, hematoma ili apcediranja (Slika 36).



**Slika 36.** Ultrazvučni prikaz patološki promjenjenog parenhima vimena krava (Orig.)

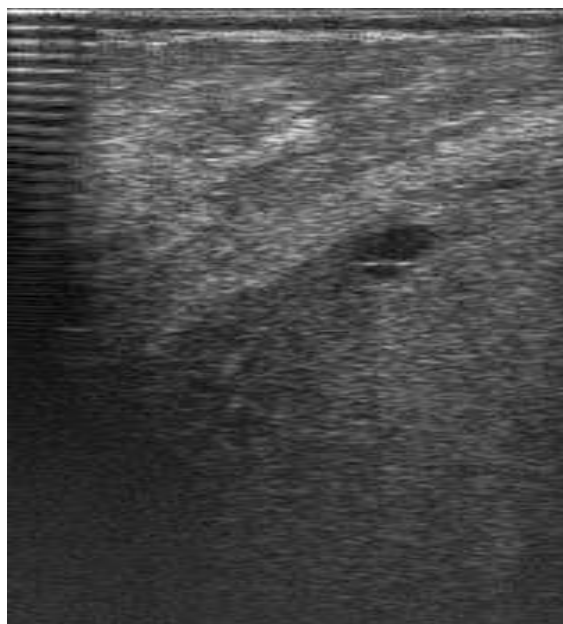


Grupa 4. Ultrazvučni prikaz patološki promjenjenog parenhima vimena koji se karakteriše nehomogenom strukturom sa izraženim hipoehogenim i hiperehogenim poljima, pri čemu se uočavaju veće hiperehogene fibrozne trake (Slika 37).



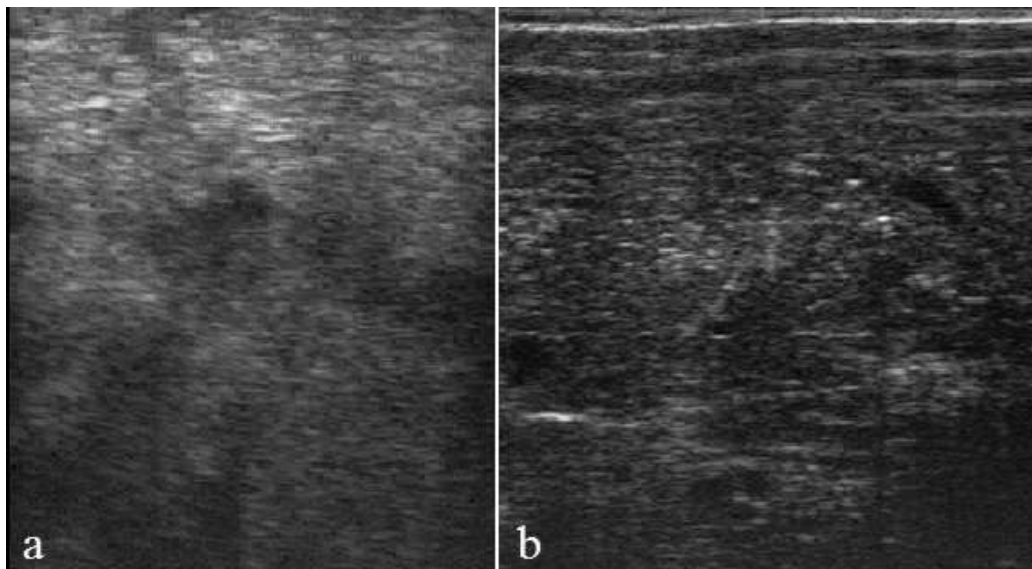
**Slika 37.** Ultrazvučni prikaz patološki promjenjenog parenhima vimena krava (Orig.)

Grupa 5: Ultrazvučni nalaz patološki promjenjenog parenhima vimena koji se vizualizuje gubitkom homogenosti i smanjenjem ehogenosti (Slika 38).



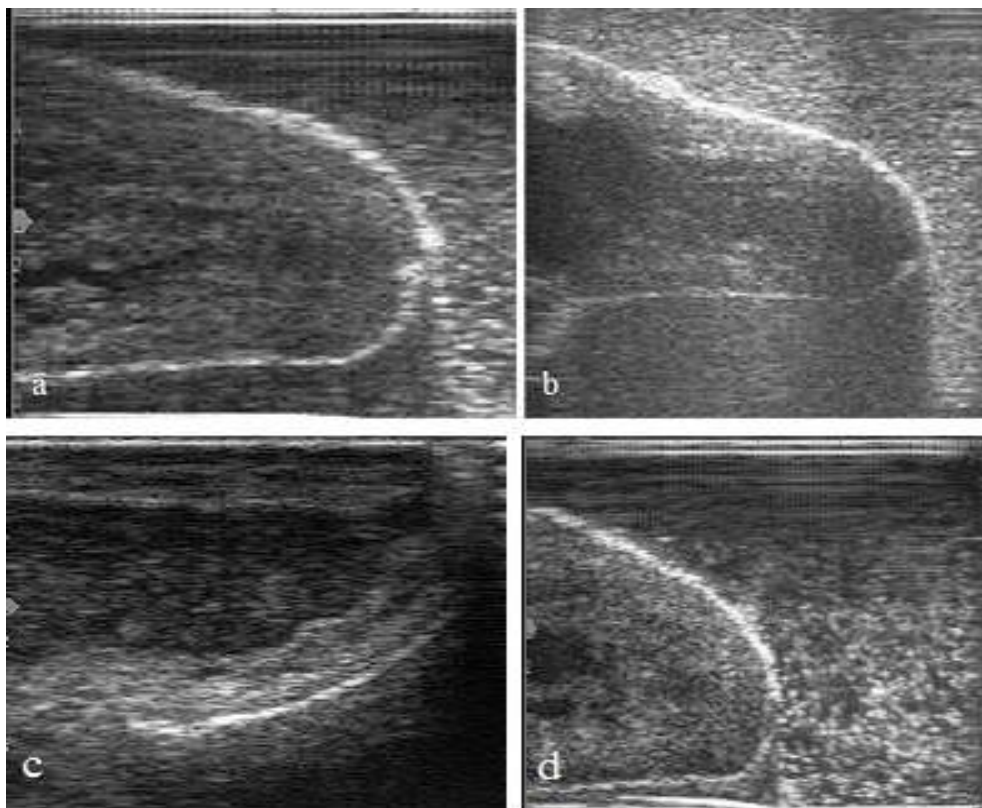
**Slika 38.** Ultrazvučni prikaz patološki promjenjenog parenhima vimena krava (Orig.)

Grupa 6: Ultrazvučni nalaz patoloških promena parenhima vimena krava koje se karakterišu pojavom višestrukih hipoehogenih struktura, pri čemu se u pojedinima uočava hiperehogeni centr (Slika 39a i b).



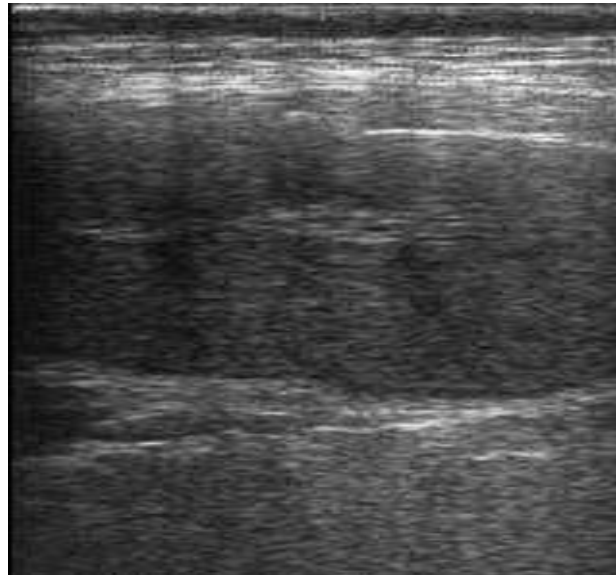
**Slika 39a i b.** Ultrazvučni prikaz patološki promjenjenog parenhima vimena krava  
(Orig.)

Grupa 7: Ultrazvučni prikaz patološki promjenjene papile vimena krava. Uočava se gubitak konture sisnog kanala, kao i nepravilne konture sisne cisterne sa nemogućnošću raspoznavanja slojeva papilarnog zida. Sisna cisterna je ispunjena hipohogenim sadržajem (Slika 40a, b, c i d).

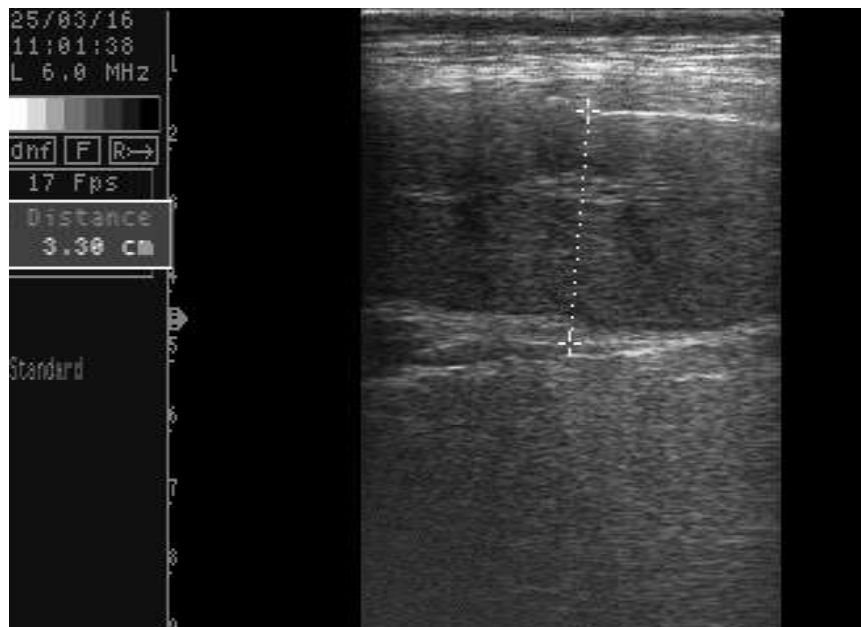


**Slika 40a, b, c i d.** Ultrazvučni prikaz patološki promjenjene papile vimena krava  
(Orig.)

Grupa 8: Ultrazvučni prikaz fiziološkog i patološki promenjenog limfnog čvora vimena krava. Jasno se uočava ehogena kapsula, homogeni hipoehogeni korteks i hiperehogeni hilusni deo limfnog čvora (Slika 41). Kod krave sa znacima inflamacije vimena, veličina čvora iznosila je 3,3 cm, pri čemu je struktura limfnog čvora očuvana (Slika42).



**Slika 41.** Ultrazvučni prikaz fiziološkog limfnog čvora vimena krava (Orig.)

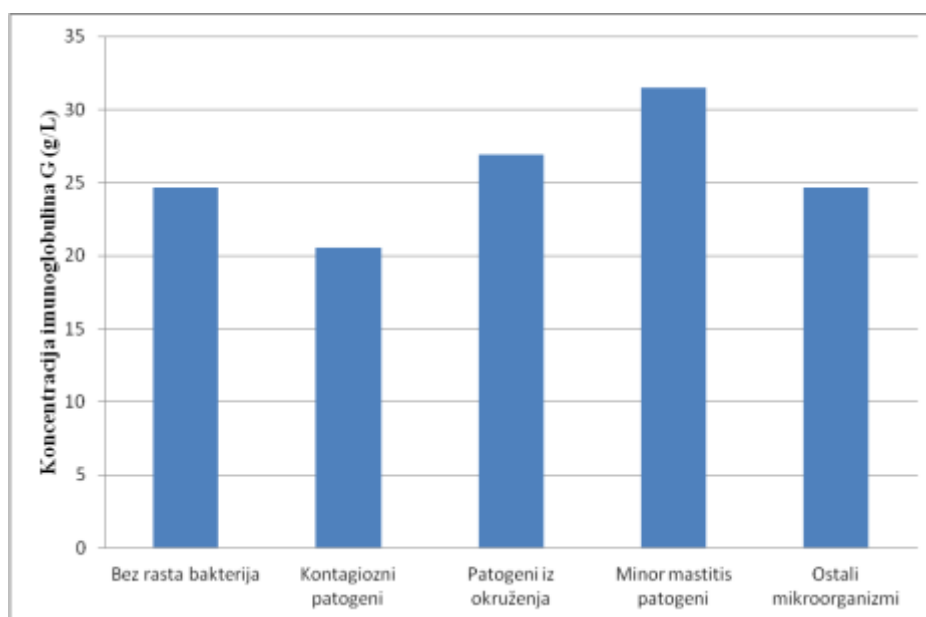


**Slika 42.** Ultrazvučni prikaz uvećanog limfnog čvora kod krave sa znacima inflamacije vimena (Orig.)

## 5.7. Koncentracija imunoglobulina G u mlečnom serumu krava

### 5.7.1. Koncentracija imunoglobulina G u mlečnom serumu krava ogledne grupe I u periodu zasušenja

Koncentracija imunoglobulina G u mlečnom serumu krava ogledne grupe I u periodu zasušenja sa pozitivnim i negativnim bakteriološkim nalazom prikazana je na grafikonu 1 i tabeli 37. Ukupno je obrađeno 150 uzoraka mleka.



Ostali mikroorganizmi-više vrsta bakterija, gljivice i plesni

**Grafikon 1.** Koncentracija imunoglobulina G (g/L) u mlečnom serumu krava ogledne grupe I u periodu zasušenja

Najmanja prosečna vrednost koncentracije imunoglobulina G u mlečnom serumu tokom perioda zasušenja uočena je kod krava inficiranih sa kontagioznim patogenima i iznosila je  $20,55 \pm 12,29$  g/L, dok je najveća prosečna vrednost koncentracija imunoglobulina G zabeležena kod infekcija sa uzročnicima male patogenosti (*minor mastitis pathogens*) gde je izmerena vrednost od  $31,52 \pm 26,48$  g/L.

**Tabela 37.** Koncentracija imunoglobulina G (g/L) u mlečnom serumu krava ogleadne grupe I u periodu zasušenja sa bakteriološkim nalazom

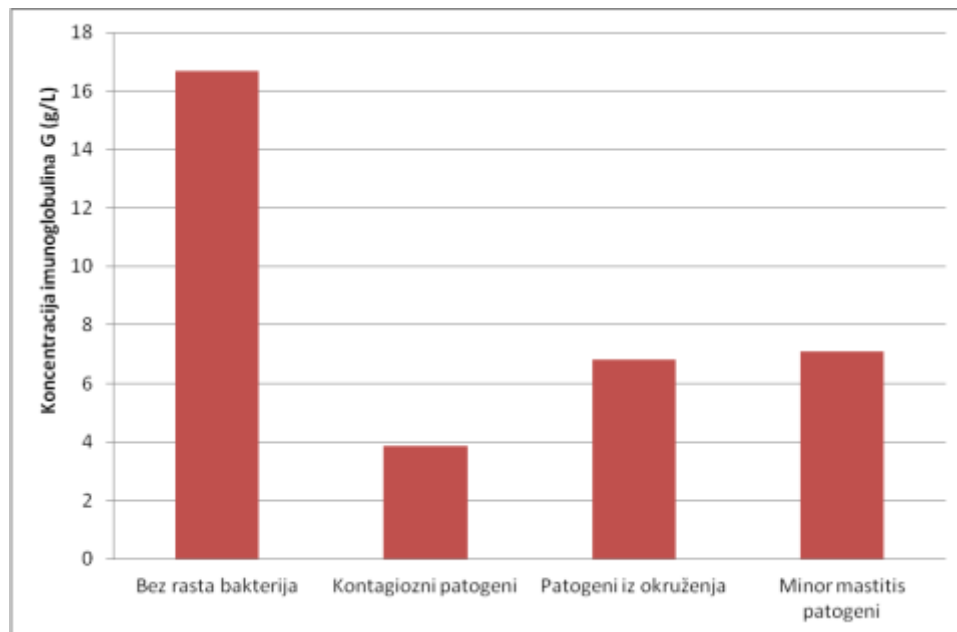
Bakteriološki nalaz	Broj uzorka	Koncentracija imunoglobulina G (g/L)		
		Minimalna vrednost	Maksimalna vrednost	Srednja vrednost±SD
Bez rasta bakterija	76	4,78	162,38	24,64±23,56
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	5,01	20,95	12,21±8,08
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3	13,39	40,04	22,51±15,18
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2	17,58	40,04	28,81±15,88
<i>Enterococcus faecium</i>	1	23,19	23,19	23,19
<i>Corynebacterium</i> spp.	49	9,09	152,24	31,15±27,3
Koagulaza negativne stafilokoke	7	5,75	59,04	34,11±21,42
Ostali mikroorganizmi*	9	4,62	59,04	24,68±17,51

\* više vrsta bakterija, gljivice i plesni

Tokom perioda zasušenja kod krava ogleadne grupe I, najviša koncentracija imunoglobulina G izmerena je kod uzoraka gde nisu bile izolovane bakterije i iznosila je 162,38 g/L. Najmanju vrednost imunoglobulina G imali su uzorci mleka gde su izolovane više vrsta bakterija, gljivice i plesni (4,62 g/L).

### 5.7.2. Koncentracija imunoglobulina G u mlečnom serumu krava ogleadne grupe I u periodu rane laktacije

Koncentracija imunoglobulina G u mlečnom serumu krava u periodu rane laktacije prikazana je na grafikonu 2 i tabeli 38. Ukupno je analizirano 73 uzorka mlečnog seruma krava u ovom periodu koje su tokom perioda involucije, tj. zasušenja mlečne žlezde primale antibiotsku terapiju.



**Grafikon 2.** Koncentracija imunoglobulina G (g/L) u mlečnom serumu krava ogleadne grupe I u periodu rane laktacije

Najniža prosečna vrednost koncentracije imunoglobulina G izmerena je u uzorcima četvrti vimena inficiranih sa *major* mastitis patogenima ( $6,06 \pm 1,67$  g/L), dok najviša prosečna vrednost koncentracije imunoglobulina G je zabeležena u uzorcima mleka gde nije uočen rast bakterija i iznosila je  $16,7 \pm 27,66$  g/L.

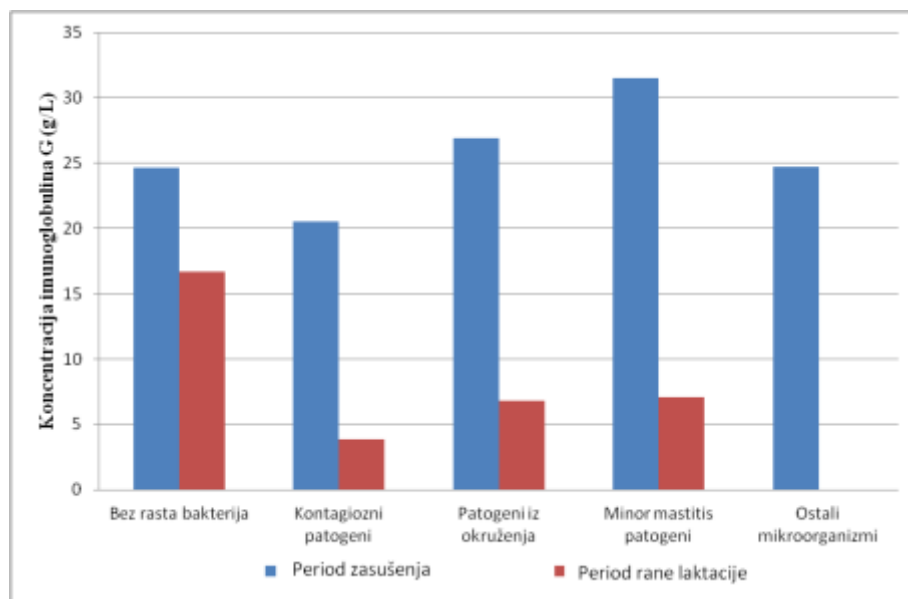
**Tabela 38.** Koncentracija imunoglobulina G (g/L) u mlečnom serumu krava ogleadne grupe I u periodu rane laktacije sa bakteriološkim nalazom

Bakteriološki nalaz	Broj uzorka	Koncentracija imunoglobulina G (g/L)		
		Minimalna vrednost	Maksimalna vrednost	Srednja vrednost $\pm$ SD
Bez rasta bakterija	38	1,05	116,59	16,7 $\pm$ 27,66
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	3,86	3,86	3,86
<i>Bacillus</i> spp.	2	5,66	7,3	6,48 $\pm$ 1,16
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	1	7,43	7,43	7,43
<i>Corynebacterium</i> spp.	30	3,16	13,62	7,2 $\pm$ 2,54
Koagulaza negativne stafilokoke	1	4,31	4,31	4,31

Tokom perioda rane laktacije, najniža i najviša koncentracija imunoglobulina G zabeležena je u neinficiranim uzorcima mleka i iznosila je 1,05 g/L i 116,59 g/L.

### 5.7.3. Uporedni prikaz nalaza koncentracije imunoglobulina G u mlečnom serumu krava ogleadne grupe I u periodu zasušenja i rane laktacije

Koncentracija imunoglobulina G u mlečnom serumu krava ogleadne grupe I u oba perioda laktacije prikazana je na grafikonima 3 i tabeli 39. Tokom perioda zasušenja, uočene su više vrednosti koncentracije imunoglobulina G u mlečnom serumu krava u odnosu na period rane laktacije.



Ostali mikroorganizmi-više vrsta bakterija, gljivice i plesni

**Grafikon 3.** Koncentracija imunoglobulina G (g/L) u mlečnom serumu krava ogleadne grupe I

Tokom perioda zasušenja, najveća prosečna vrednost koncentracije imunoglobulina G zabeležena je u mlečnom serumu iz četvrti vimena krava u kojima su izolovane bakterije ( $29,35 \pm 24,38$  g/L). Najviša prosečna vrednost koncentracija imunoglobulina G tokom perioda rane laktacije izmerena u mlečnom serumu neinficiranih krava ( $16,7 \pm 27,66$  g/L).

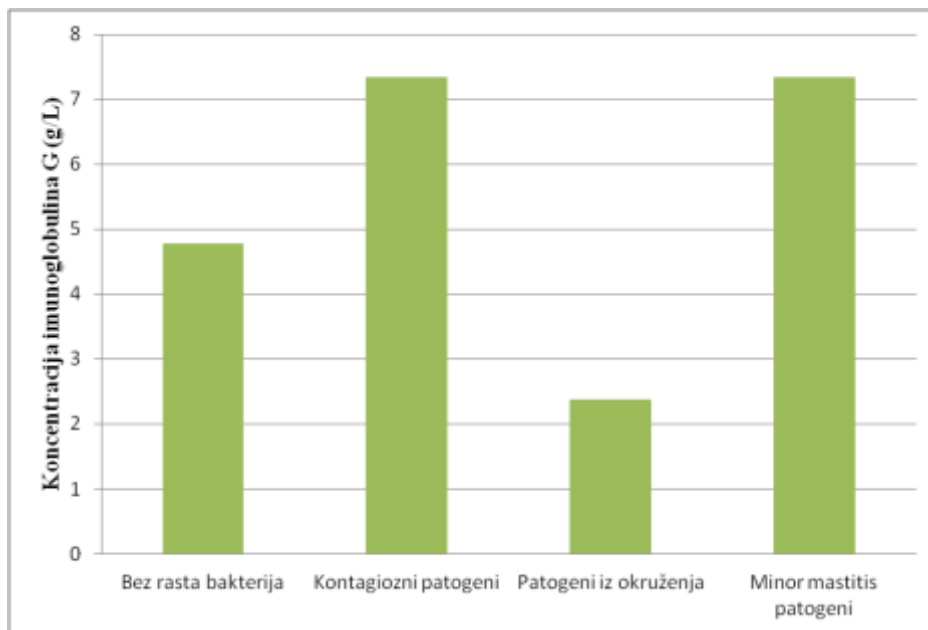


**Tabela 39.** Koncentracija imunoglobulina G (g/L) u mlečnom serumu krava ogledne grupe I u periodu zasušenja i rane laktacije

<b>Period zasušenja</b>				
<b>Bakteriološki nalaz</b>	<b>Broj uzorka</b>	<b>Koncentracija imunoglobulina (g/L)</b>		
		<b>Minimalna vrednost</b>	<b>Maksimalna vrednost</b>	<b>Srednja vrednost±SD</b>
Bez rasta bakterija	76	4,78	162,38	24,64±23,56
Pozitivan nalaz	74	4,62	152,24	29,35±24,38
Ukupno	150	4,62	162,38	26,96±24
<b>Period rane laktacije</b>				
<b>Bakteriološki nalaz</b>	<b>Broj uzorka</b>	<b>Koncentracija imunoglobulina (g/L)</b>		
		<b>Minimalna vrednost</b>	<b>Maksimalna vrednost</b>	<b>Srednja vrednost±SD</b>
Bez rasta bakterija	38	1,05	116,59	16,7±27,66
Pozitivan nalaz	35	3,16	13,62	6,98±2,47
Ukupno	73	1,05	116,59	12,04±20,49

#### **5.7.4. Koncentracija imunoglobulina G u mlečnom serumu krava ogledne grupe II u periodu predzasušenja**

Koncentracija imunoglobulina G u mlečnom serumu krava ogledne grupe II u periodu predzasušenja sa pozitivnim i negativnim bakteriološkim nalazom prikazana je na grafikonu 4 i u tabeli 40. Ukupno je obrađeno 55 pojedinačna uzorka mleka.



**Grafikon 4.** Koncentracija imunoglobulina G (g/L) u mlečnom serumu krava ogledne grupe II u periodu predzasušavanja

Tokom perioda predzasušavanja, najniža koncentracija imunoglobulina G je izmerena u uzorcima mleka krava inficiranih sa patogenima iz okruženja i iznosila je  $2,38 \pm 0,11$  g/L. Najviše vrednosti koncentracije imunoglobulina G zabeležene su u uzorcima gde su izolovani kontagiozni patogeni i *minor* mastitis patogeni.

**Tabela 40.** Koncentracija imunoglobulina G (g/L) u mlečnom serumu krava ogledne grupe II u periodu predzasušavanja sa bakteriološkim nalazom

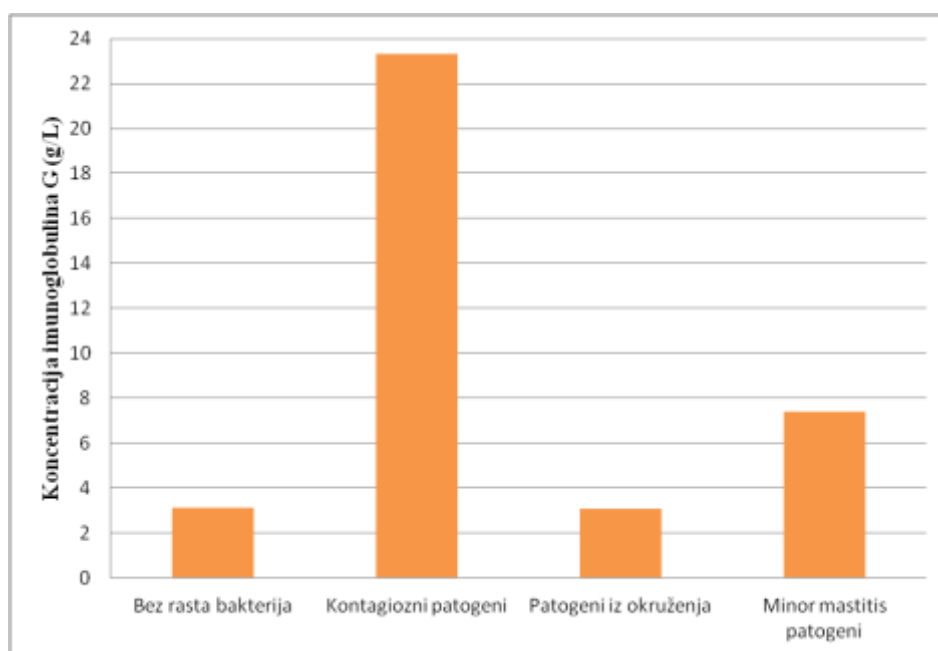
Bakteriološki nalaz	Broj uzorka	Koncentracija imunoglobulina G (g/L)		
		Minimalna vrednost	Maksimalna vrednost	Srednja vrednost $\pm$ SD
Bez rasta bakterija	20	0,46	8,49	4,78 $\pm$ 2,21
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	5,75	10,02	7,35 $\pm$ 2,33
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	3	2,25	2,44	2,38 $\pm$ 0,11
<i>Corynebacterium</i> spp.	17	2,63	15,77	6,61 $\pm$ 3,53
Koagulaza negativne stafilokoke	12	2,06	22,28	8,39 $\pm$ 5,22

Tokom perioda zasušavanja kod krava ogledne grupe II, najviša koncentracija imunoglobulina G izmerena je kod uzoraka gde su izolovane koagulaza negativne

stafilokoke i iznosila je 22,28 g/L. Najmanja vrednost imunoglobulina G zabeležena je u uzorku mleka gde nije uočen rast bakterija (0,46 g/L).

### 5.7.5. Koncentracija imunoglobulina G u mlečnom serumu krava ogledne grupe II u periodu rane laktacije

Na grafikonu 5 prikazana je koncentracija imunoglobulina G u mlečnom serumu krava ogledne grupe II u period rane laktacije. Najviša koncentracija imunoglobulina G u mlečnom serumu krava uočena je kod uzoraka inficiranih sa kontagioznim patogenima.



**Grafikon 5.** Koncentracija imunoglobulina G (g/L) u mlečnom serumu krava ogledne grupe II u periodu rane laktacije

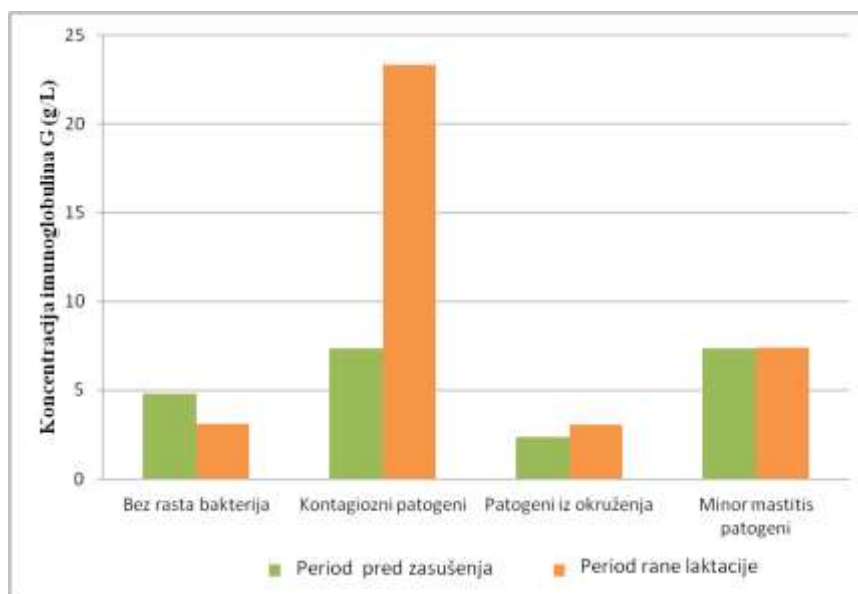
U tabeli 41 prikazana je koncentracija imunoglobulina G u mlečnom serumu krava sa bakteriološkim nalazom gde se uočava da je najviša prosečna vrednost koncentracija imunoglobulina G izmerena u mlečnom serumu gde su izolovane bakterije *Staphylococcus aureus* i iznosila je  $23,32 \pm 7,33$  g/L. Najmanja koncentracija imunoglobulina G je zabeležena u uzorcima mleka gde nije uočen rast bakterija (1,05 g/L).

**Tabela 41.** Koncentracija imunoglobulina G (g/L) u mlečnom serumu krava ogledne grupe II u periodu rane laktacije sa bakteriološkim nalazom

Bakteriološki nalaz	Broj uzorka	Koncentracija imunoglobulina G (g/L)		
		Minimalna vrednost	Maksimalna vrednost	Srednja vrednost±SD
Bez rasta bakterija	24	1,05	8,77	3,12±2,08
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	18,14	28,5	23,32±7,33
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	2	2,44	3,64	3,05±0,86
<i>Corynebacterium</i> spp.	7	1,21	13,27	6,04±5,09
Koagulaza negativne stafilokoke	5	5,01	19,23	9,3±6,06

#### 5.7.6. Uporedni prikaz nalaza koncentracije imunoglobulina G u mlečnom serumu krava ogledne grupe II u periodu predzasušnja i rane laktacije

Koncentracija imunoglobulina G u mlečnom serumu krava ogledne grupe II u oba perioda laktacije prikazana je na grafikonima 6 i tabeli 42. Tokom perioda rane laktacije uočava se znatno veća koncentracija imunoglobulina G u mlečnom serumu krava inficiranih kontagioznim patogenima, dok je kod uzoraka inficiranih *minor* mastitis patogenima koncentracija imunoglobulina G približno ista u oba perioda (Grafikon 21).



**Grafikon 6.** Koncentracija imunoglobulina G (g/L) u mlečnom serumu krava ogledne grupe II

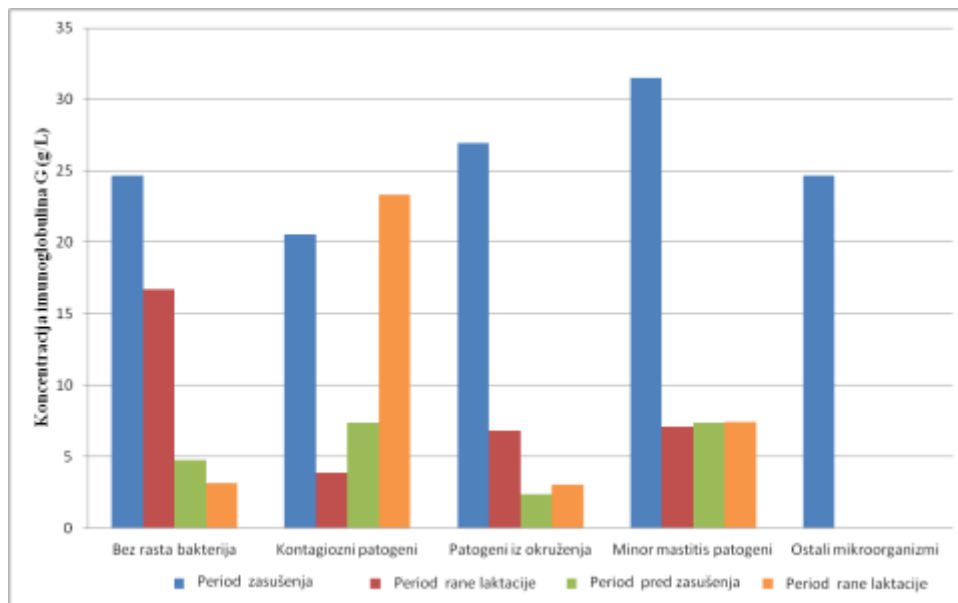
Tokom perioda predzasušavanja i rane laktacije, najveća prosečna vrednost koncentracije imunoglobulina G zabeležena je u mlečnom serumu iz četvrti vimena krava u kojima su izolovane bakterije (Tabela 41).

**Tabela 42.** Koncentracija imunoglobulina G (g/L) u mlečnom serumu krava ogleadne grupe I u periodu predzasušavanja i rane laktacije

<b>Period predzasušavanja</b>				
<b>Bakteriološki nalaz</b>	<b>Broj uzorka</b>	<b>Koncentracija imunoglobulina (g/L)</b>		
		<b>Minimalna vrednost</b>	<b>Maksimalna vrednost</b>	<b>Srednja vrednost±SD</b>
Bez rasta bakterija	20	0,46	8,49	4,78±2,21
Pozitivan nalaz	35	2,06	22,28	6,92±4,2
Ukupno	55	0,46	22,28	6,14±3,73
<b>Period rane laktacije</b>				
<b>Bakteriološki nalaz</b>	<b>Broj uzorka</b>	<b>Koncentracija imunoglobulina (g/L)</b>		
		<b>Minimalna vrednost</b>	<b>Maksimalna vrednost</b>	<b>Srednja vrednost±SD</b>
Bez rasta bakterija	24	1,05	8,77	3,12±2,08
Pozitivan nalaz	16	1,21	28,5	8,85±7,74
Ukupno	40	1,05	28,5	5,41±5,8

#### **5.7.7. Uporedni prikaz nalaza koncentracije imunoglobulina G u mlečnom serumu krava ogleadne grupe I i II u periodu predzasušavanja i rane laktacije**

Na grafikonu 7 uočava se da je najviša koncentracija imunoglobulina G izmerena u uzorcima mleka tokom periodu zasušavanja ogleadne grupe I gde su izolovani *minor* mastitis patogeni. U uzorcima mleka gde su identifikovani kontagiozni patogeni, najviša koncentracija imunoglobulina G zabeležena je tokom perioda rane laktacije ogleadne grupe II.



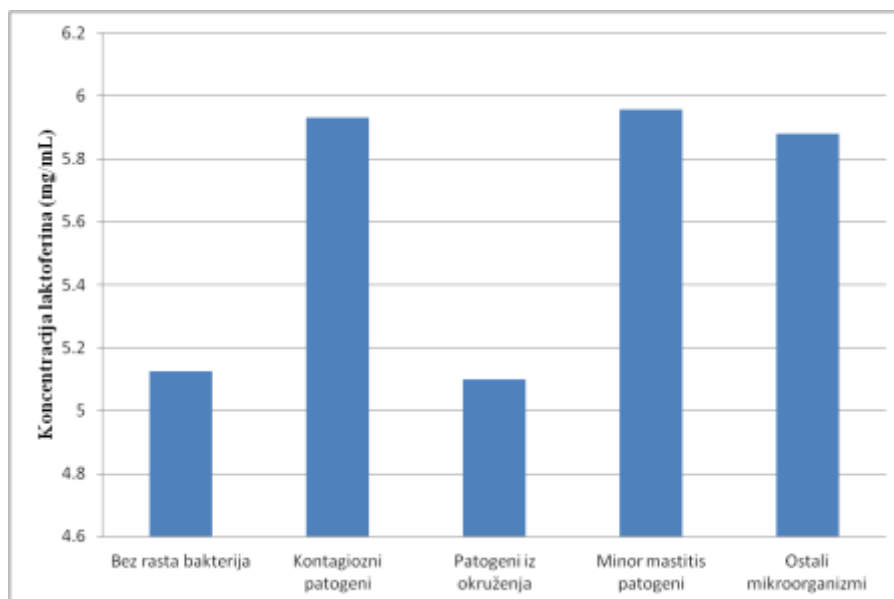
Ostali mikroorganizmi-više vrsta bakterija, gljivice i plesni

**Grafikon 7.** Koncentracija imunglobulina G (g/L) u mlečnom serumu krava ogleadne grupe I i II

## 5.8. Koncentracija laktoferina u mleku krava

### 5.8.1. Koncentracija laktoferina u mleku krava ogleadne grupe I u periodu zasušenja

Najniža prosečna vrednost koncentracije laktoferina uočena je kod uzoraka mleka iz neinficiranih četvrti vimena i četvrti vimena inficiranih sa patogenima iz okruženja, dok najviša vrednost koncentracije laktoferina bila izmerena u uzorcima mleka iz četvrti vimena inficiranih sa *minor* mastitis patogenima (Grafikon 8).



Ostali mikroorganizmi- više vrsta bakterija, gljivice i plesni

**Grafikon 8.** Koncentracija laktoferina (mg/mL) u mleku krava ogleadne grupe I u periodu predzasušenja

Najmanja prosečna vrednost koncentracije laktoferina u mleku tokom perioda zasušavanja uočena je kod krava u čijem mleku je identifikovana bakterija *Streptococcus dysgalactiae* i iznosila je  $4,7089 \pm 0,3825$  mg/mL, dok je najveća prosečna vrednost koncentracija laktoferina zabeležena u mleku krava inficiranih sa *Streptococcus agalactiae* gde je izmerena vrednost od  $6,4827 \pm 0,5078$  mg/mL (Tabela 43).

**Tabela 43.** Koncentracija laktoferina (mg/mL) u mleku krava ogledne grupe I u periodu zasušenja sa bakteriološkim nalazom

Bakteriološki nalaz	Broj uzorka	Koncentracija laktoferina (mg/mL)		
		Minimalna vrednost	Maksimalna vrednost	Srednja vrednost±SD
Bez rasta bakterija	76	0,7267	8,8492	5,1237±1,7688
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	5,6797	6,6774	6,2089±0,5016
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3	5,9099	6,8777	6,4827±0,5078
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2	4,6818	4,7359	4,7089±0,3825
<i>Enterococcus faecium</i>	1	5,8833	5,8833	5,8833
<i>Corynebacterium</i> spp.	49	2,3868	9,8413	6,0497±1,6774
Koagulaza negativne stafilokoke	7	4,0753	7,6016	5,2961±1,3633
Ostali mikroorganizmi*	9	2,2582	8,3376	5,8789±2,3538

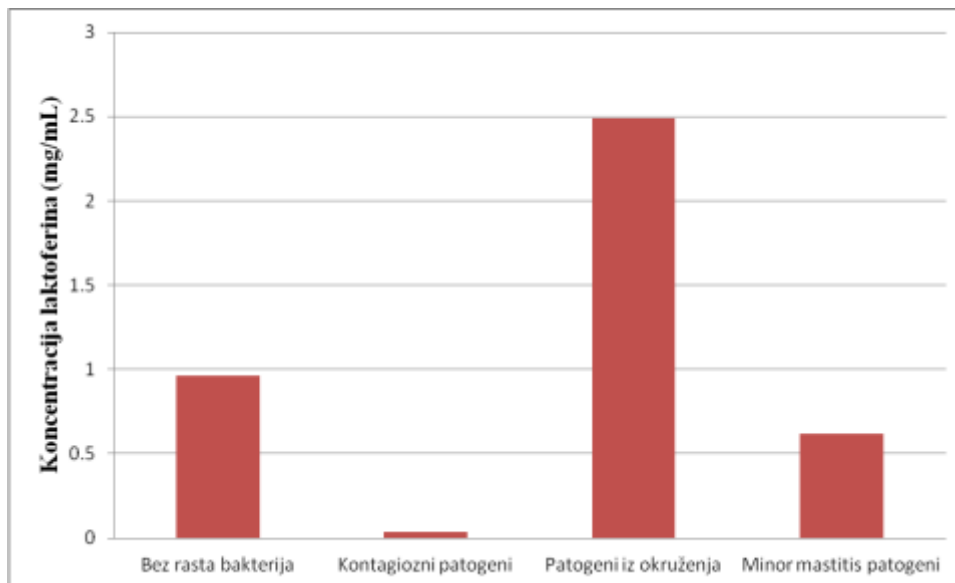
\* više vrsta bakterija, gljivice i plesni

### 5.8.2. Koncentracija laktoferina u mleku krava ogledne grupe I u periodu rane laktacije

U periodu rane laktacije, koncentracija laktoferina je određena u ukupno 73 uzorka mleka, pri čemu su 20 uzorka imala koncentraciju laktoferina ispod merljive vrednosti. Koncentracija laktoferina je bila ispod merljivih vrednosti kod 13 uzorka sa negativnim bakteriološkim rastom i 7 uzorka sa pozitivnim nalazom (*Corynebacterium* spp. 4, koagulaza negativne stafilokoke 1 i *Bacillus* spp. 2).

Najniža prosečna vrednost koncentracije laktoferina zabeležena je kod uzoraka mleka iz četvrti vimena inficiranih sa kontagioznim patogenima, dok je najviša vrednost uočena kod uzoraka mleka iz četvrti vimena inficiranih sa patogenima iz okruženja (Grafikon 9).





**Grafikon 9.** Koncentracija laktoferina (mg/mL) u mleku krava ogledne grupe I u periodu rane laktacije

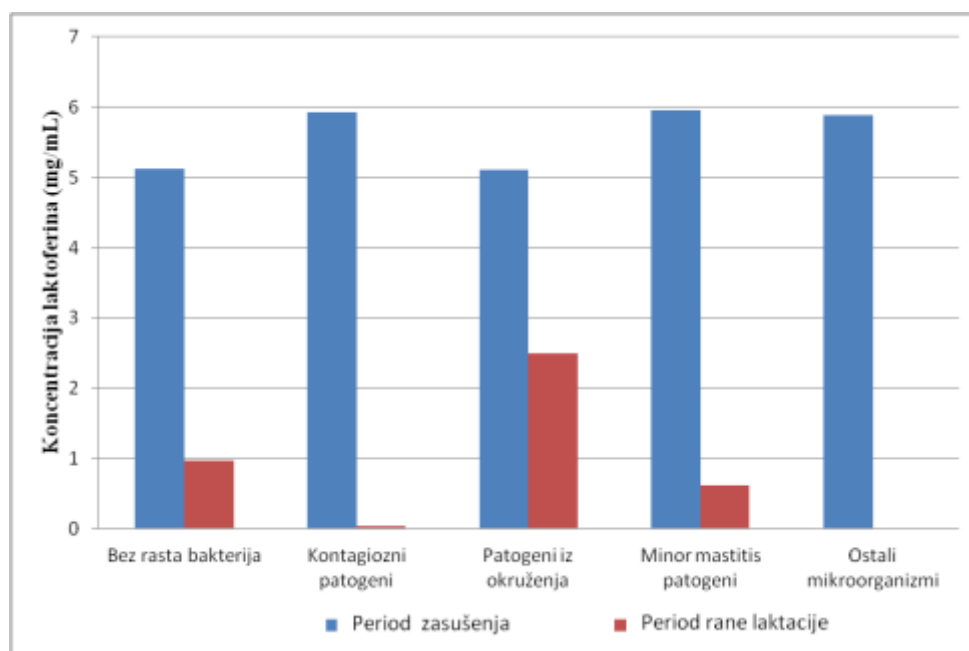
Najniža i najviša vrednost koncentracije laktoferina u periodu rane laktacije izmerena je u uzorcima mleka iz neinficiranih četvrti vimena i iznosila je 0,0015 mg/mL i 5,9391 mg/mL. Maksimalna vrednost koncentracije laktoferina u uzorcima mleka inficiranih sa *Corynebacterium* spp. iznosila je 3,9664 mg/mL, dok kod infekcije sa *Arcanobacterium pyogenes* je iznosila 2,489 mg/mL (Tabela 44).

**Tabela 44.** Koncentracija laktoferina (mg/mL) u mleku krava ogledne grupe I u periodu rane laktacije sa bakteriološkim nalazom

Bakteriološki nalaz	Broj uzorka	Koncentracija laktoferina (mg/mL)		
		Minimalna vrednost	Maksimalna vrednost	Srednja vrednost±SD
Bez rasta bakterija	25	0,0015	5,9391	0,9655±1,64
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	0,039	0,039	0,039
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	1	2,489	2,489	2,489
<i>Corynebacterium</i> spp.	26	0,0211	3,9664	0,6163±1,0882

### 5.8.3. Uporedni prikaz nalaza koncentracije laktoferina u mleku krava ogleadne grupe I u periodu zasušenja i rane laktacije

Koncentracija laktoferina u mleku krava ogleadne grupe I u oba perioda laktacije prikazana je na grafikonu 10 i tabeli 45. Koncentracija laktoferina je tokom perioda zasušenja bila znatno viša u odnosu na njene vrednosti u periodu rane laktacije.



Ostali mikroorganizmi- više vrsta bakterija, gljivice i plesni

**Grafikon 10.** Koncentracija laktoferina (mg/mL) u mleku krava ogleadne grupe I

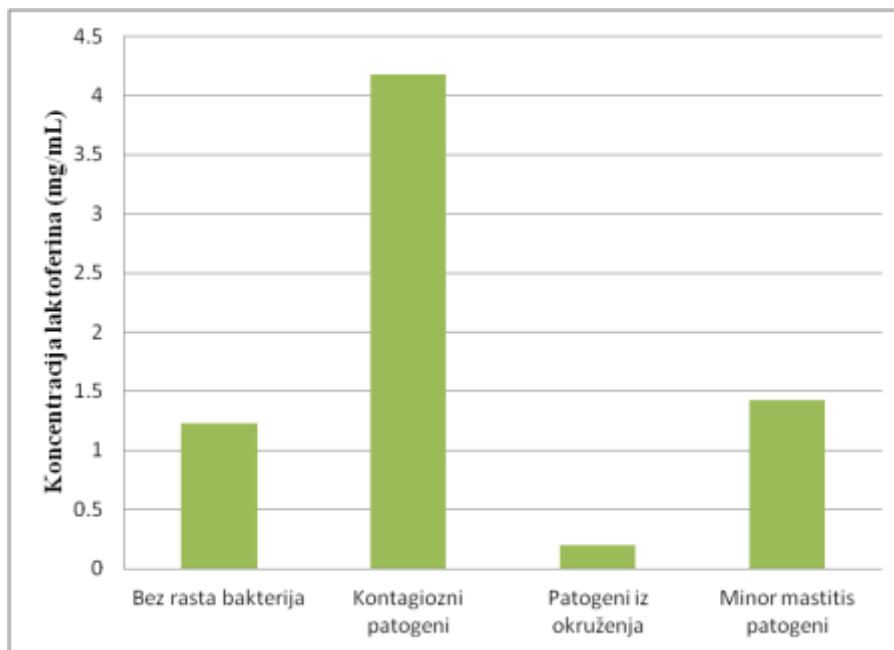
Najviša prosečna vrednost koncentracije laktoferina u mleku zabeležena je tokom perioda zasušenja kod inficiranih četvrti vimena krava i iznosila je  $5,9431 \pm 1,6519$  mg/mL, dok je tokom perioda rane laktacije najviša prosečna vrednost koncentracije laktoferina u mleku uočena kod krava sa negativnim bakteriološkim nalazom ( $0,9655 \pm 1,64$  mg/mL).

**Tabela 45.** Koncentracija laktoferina (mg/mL) u mleku krava ogledne grupe I u periodu zasušenja i rane laktacije

<b>Period zasušenja</b>				
<b>Bakteriološki nalaz</b>	<b>Broj četvrti</b>	<b>Koncentracija laktoferina (mg/mL)</b>		
		<b>Minimalna vrednost</b>	<b>Maksimalna vrednost</b>	<b>Srednja vrednost±SD</b>
Bez rasta bakterija	76	0,7267	8,8492	5,1237±1,7688
Pozitivan nalaz	74	2,2582	9,8413	5,9431±1,6519
Ukupno	150	0,7267	9,8413	5,5279±1,7552
<b>Period rane laktacije</b>				
<b>Bakteriološki nalaz</b>	<b>Broj četvrti</b>	<b>Koncentracija laktoferina (mg/mL)</b>		
		<b>Minimalna vrednost</b>	<b>Maksimalna vrednost</b>	<b>Srednja vrednost±SD</b>
Bez rasta bakterija	38	0,0015	5,9391	0,9655±1,64
Pozitivan nalaz	35	0,0211	3,9664	0,6625±1,1119
Ukupno	73	0,0015	5,9391	0,8055±1,3808

#### **5.8.4. Koncentracija laktoferina u mleku krava ogledne grupe II u periodu predzasušenja**

Najniža prosečna vrednost koncentracije laktoferina uočena je kod uzoraka mleka iz neinficiranih četvrti vimena i četvrti vimena inficiranih sa patogenima iz okruženja, dok najviša vrednost koncentracije laktoferina je bila izmerena u uzorcima mleka iz četvrti vimena inficiranih sa kontagioznim patogenima (Grafikon 11).



**Grafikon 11.** Koncentracija laktoferina (mg/mL) u mleku krava ogledne grupe II u periodu predzasušnja

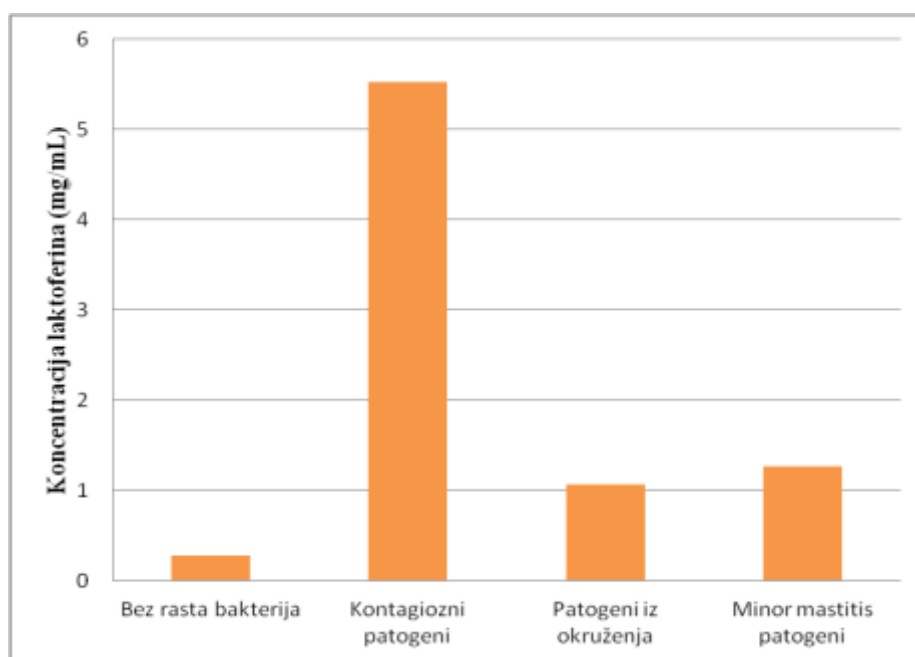
Najniža koncentracija laktoferina u mleku krava ogledne grupe II u periodu predzasušnja uočena je u uzorcima gde je izolovana bakterija *Arcanobacterium pyogenes* i iznosila je 0,033 mg/mL. Visoke koncentracije laktoferina zabeležene su u mleku krava inficiranih sa *major* i *minor* mastitis patogenima (Tabela 46).

**Tabela 46.** Koncentracija laktoferina (mg/mL) u mleku krava ogledne grupe II u periodu predzasušnja sa bakteriološkim nalazom

Bakteriološki nalaz	Broj uzorka	Koncentracija laktoferina (mg/mL)		
		Minimalna vrednost	Maksimalna vrednost	Srednja vrednost±SD
Bez rasta bakterija	20	0,2472	4,3377	1,2288±1,0808
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	3,2898	4,9884	4,1816±0,8525
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	3	0,033	0,3066	0,1989±0,1458
<i>Corynebacterium</i> spp.	17	0,1648	4,6166	1,4154±1,4039
Koagulaza negativne stafilokoke	12	0,2439	4,6123	1,4292±1,4464

### 5.8.5. Koncentracija laktoferina u mleku krava ogledne grupe II u periodu rane laktacije

Najniža prosečna vrednost koncentracije laktoferina uočena je kod uzoraka mleka iz neinficiranih četvrti vimena, dok najviša vrednost koncentracije laktoferina je bila izmerena u uzorcima mleka iz četvrti vimena inficiranih sa kontagioznim patogenima (Grafikon 12).



Grafikon 12. Koncentracija laktoferina (mg/mL) u mleku krava ogledne grupe II u periodu rane laktacije

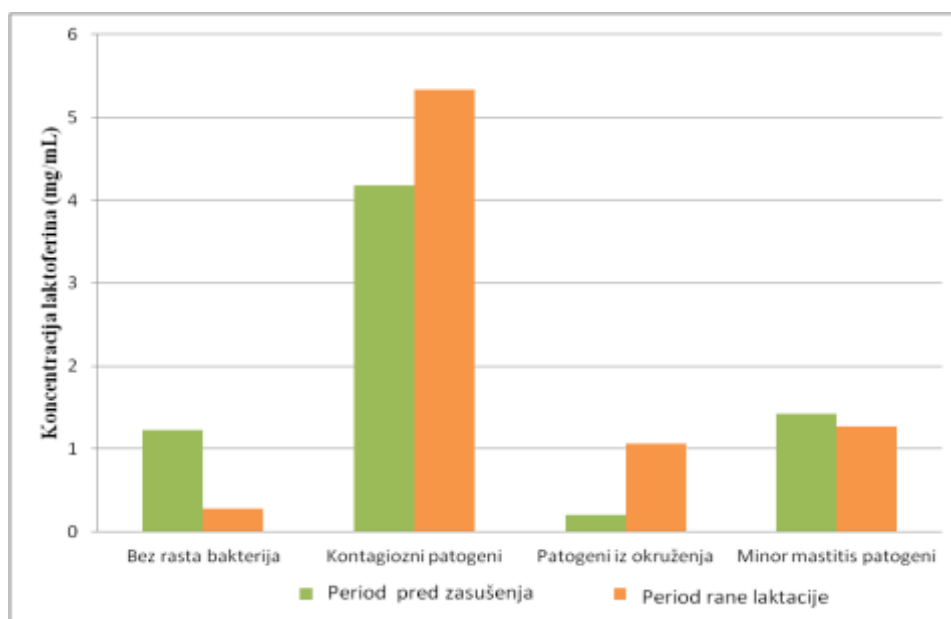
U tabeli 47 data je koncentracija laktoferina u mleku krava tokom perioda rane laktacije gde se uočava da je najveća koncentracija laktoferina izmerena u uzorcima mleka inficiranih bakterijom *Staphylococcus aureus* (5,5259 mg/mL), dok znatno manje vrednosti laktoferina su uočeni u neinficiranim uzorcima mleka (0,0216 mg/mL) i uzorcima gde su izolovane bakterije *Corynebacterium* spp. (0,0429 mg/mL).

**Tabela 47.** Koncentracija laktoferina (mg/mL) u mleku krava ogledne grupe II u periodu rane laktacije sa bakteriološkim nalazom

Bakteriološki nalaz	Broj uzorka	Koncentracija laktoferina (mg/mL)		
		Minimalna vrednost	Maksimalna vrednost	Srednja vrednost±SD
Bez rasta bakterija	24	0,0216	1,0532	0,2794±0,3051
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	5,1349	5,5259	5,3304±0,2765
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	2	0,2129	1,9226	1,0678±1,2089
<i>Corynebacterium</i> spp.	7	0,0429	3,3854	0,7111±1,1909
Koagulaza negativne stafilokoke	5	0,1837	4,6347	2,0565±1,8083

#### 5.8.6. Uporedni prikaz nalaza koncentracije laktoferina u mleku krava ogledne grupe II u periodu predzasušnja i rane laktacije

Koncentracija laktoferina u mleku krava ogledne grupe II u oba perioda laktacije prikazana je na grafikonu 13 i tabeli 48. Na grafikonu 24 primećuje se da je tokom perioda rane laktacije u uzorcima mleka inficiranih kontagioznim patogenima izmerena najveća koncentracija laktoferina. Najmanja vrednost koncentracije laktoferina zabeležena je tokom perioda predzasušnja u uzorcima gde su identifikovani patogeni iz okruženja.



**Grafikon 13.** Koncentracija laktoferina (mg/mL) u mleku krava ogledne grupe II

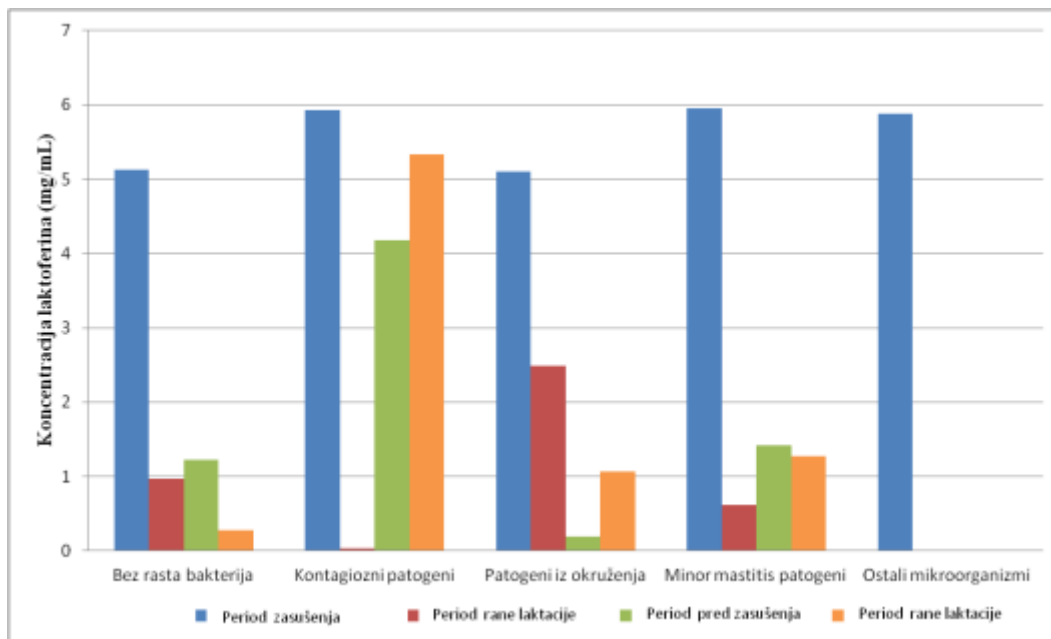
Najviša prosečna vrednost koncentracije laktoferina u mleku krava zabeležena je tokom oba perioda laktacije kod inficiranih četvrti vimena krava. Posmatrajući sve uzorke tokom oba perioda laktacije, uzorci mleka tokom perioda predzasušnja su imali veći sadržaj laktoferina ( $1,4351 \pm 1,4031$  mg/mL), u odnosu na uzorke tokom perioda rane laktacije ( $0,8691 \pm 1,4387$  mg/mL).

**Tabela 48.** Koncentracija laktoferina (mg/mL) u mleku krava ogledne grupe II u periodu predzasušnja i rane laktacije

<b>Period predzasušnja</b>				
<b>Bakteriološki nalaz</b>	<b>Broj četvrti</b>	<b>Koncentracija laktoferina (mg/mL)</b>		
		<b>Minimalna vrednost</b>	<b>Maksimalna vrednost</b>	<b>Srednja vrednost<math>\pm</math>SD</b>
Bez rasta bakterija	20	0,2472	4,3377	1,2288 $\pm$ 1,0808
Pozitivan nalaz	35	0,033	4,9884	1,553 $\pm$ 1,5603
Ukupno	55	0,033	4,9884	1,4351 $\pm$ 1,4031
<b>Period rane laktacije</b>				
<b>Bakteriološki nalaz</b>	<b>Broj četvrti</b>	<b>Koncentracija laktoferina (mg/mL)</b>		
		<b>Minimalna vrednost</b>	<b>Maksimalna vrednost</b>	<b>Srednja vrednost<math>\pm</math>SD</b>
Bez rasta bakterija	24	0,0216	1,0532	0,2794 $\pm$ 0,3051
Pozitivan nalaz	16	0,0429	5,5259	1,7535 $\pm$ 1,9617
Ukupno	40	0,0216	5,5259	0,8691 $\pm$ 1,4387

#### **5.8.7. Uporedni prikaz nalaza koncentracije laktoferina u mleku krava ogledne grupe I i II u periodu predzasušnja i rane laktacije**

Najviša koncentracija laktoferina zabeležena je u mleku krava ogledne grupe I tokom perioda rane laktacije. Najniža vrednost koncentracije laktoferina izmerena je u uzorcima mleka ogledne grupe I tokom perioda rane laktacije gde su izolovani kontagiozni patogeni, dok je tokom perioda zasušenja ogledne grupe I i tokom oba perioda ogledne grupe II detektovana znatno veća koncentracija laktoferina (Grafikon 14).



Ostali mikroorganizmi-više vrsta bakterija, gljivice i plesni

**Grafikon 14.** Koncentracija laktoferina (mg/mL) u mleku krava ogledne grupe I i II

## 5.9. Rezultati statističkog testa korelacije koncentracije imunoglobulina G i laktoferina u mleku krava

### 5.9.1. Rezultati statističkog testa korelacije koncentracije imunoglobulina G i laktoferina u mleku krava ogledne grupe I u period zasušenja i rane laktacije

Statističkom analizom korelacije koncentracije imunoglobulina G i laktoferina u svim uzorcima mleka krava u periodu zasušenja uočena je pozitivna korelacija, što ukazuje da sa povećanjem koncentracije imunoglobulina G u mleku krava dolazi i do povećanja koncentracije laktoferina (Tabela 49). Korelacija je iznosila + 0,332. Negativna korelacija (-0,605) uočena je u uzorcima mleka inficiranih *major* mastitis patogenima tokom perioda zasušenja.

Tokom perioda rane laktacije, statističkom metodom korelacije koncentracije imunoglobulina G i laktoferina u mleku krava zabeležena je pozitivna korelacija (+0,179).



**Tabela 49.** Rezultati statističkog testa korelacije koncentracije imunoglobulina G i laktoferina u mleku krava ogledne grupe I u periodu zasušenja i rane laktacije

<b>Period zasušenja</b>		
<b>Bakteriološki nalaz</b>	<b>N</b>	<b>Korelacija (r)</b>
Bez porasta bakterija	76	+0,362**
<i>Major</i> mastitis patogeni	9	-0,605
<i>Minor</i> mastitis patogeni	56	+0,348**
Ukupno	150	+0,332**
<b>Period rane laktacije</b>		
<b>Bakteriološki nalaz</b>	<b>N</b>	<b>Korelacija (r)</b>
Bez porasta bakterija	25	+0,159
<i>Major</i> mastitis patogeni	2	+1,000**
<i>Minor</i> mastitis patogeni	26	+0,459*
Ukupno	53	+0,179

\* Korelacija signifikantna na nivou 0,05

\*\* Korelacija signifikantna na nivou 0,01

### **5.9.2. Rezultati statističkog testa korelacije koncentracije imunoglobulina G i laktoferina u mleku krava ogledne grupe II u period predzasušenja i rane laktacije**

Statističkom analizom korelacije koncentracije imunoglobulina G i laktoferina u svim uzorcima mleka krava u periodu predzasušenja uočena je pozitivna korelacija, što ukazuje da sa povećanjem koncentracije imunoglobulina G u mleku krava dolazi i do povećanja koncentracije laktoferina (Tabela 50). Korelacija je iznosila +0,359.

Tokom perioda rane laktacije, statističkom metodom korelacije koncentracije imunoglobulina G i laktoferina u mleku krava zabeležena je značajna i pozitivna korelacija (+0,900).

**Tabela 50.** Rezultati statističkog testa korelacije koncentracije imunoglobulina G i laktoferina u mleku krava ogledne grupe II u periodu predzasušnja i rane laktacije

<b>Period predzasušnja</b>		
<b>Bakteriološki nalaz</b>	<b>N</b>	<b>Korelacija (r)</b>
Bez porasta bakterija	20	+0,382
<i>Major</i> mastitis patogeni	6	+0,851*
<i>Minor</i> mastitis patogeni	29	+0,327
Ukupno	55	+0,359**
<b>Period rane laktacije</b>		
<b>Bakteriološki nalaz</b>	<b>N</b>	<b>Korelacija (r)</b>
Bez porasta bakterija	24	+0,805**
<i>Major</i> mastitis patogeni	4	+0,934
<i>Minor</i> mastitis patogeni	12	+0,817**
Ukupno	40	+0,900**

\* Korelacija signifikantna na nivou 0,05

\*\* Korelacija signifikantna na nivou 0,01

## 6. DISKUSIJA

### 6.1. Klinički pregled vimena krava

U cilju kontrole zdravlja vimena krava neophodno je tokom perioda laktacije i involucije sprovoditi kliničke preglede vimena radi otkrivanja poremećaja funkcije. Praćenje zdravstvenog stanja visokomlečnih krava je neophodno kako bi se dobilo kvalitetno i higijenski ispravno mleko (Boboš i sar., 2012). U intenzivnoj proizvodnji mleka, mastitisi, odnosno zapaljenja mlečne žlezde, predstavljaju jednu od najvažnijih i najaktualnijih bolesti visokomlečnih krava. Očuvanje zdravlja vimena krava je od presudnog značaja radi postizanja maksimalne produktivnosti i profitabilnosti. Zapaljenje mlečne žlezde je multikauzalna bolest i obično nastaje interakcijom mikroorganizma, domaćina i okoline, pri čemu se javlja u kliničkom i subkliničkom obliku. Kliničkim pregledom krave, kao i njene mlečne žlezde, lako se mogu otkriti klinički oblici mastitisa prisustvom glavnih znakova bolesti (crvenilo, otok, temperiranost, bolnost i smanjena proizvodnja mleka), dok je dijagnostika subkliničkog mastitisa moguća izolacijom uzročnika bolesti i otkrivanjem inflamatornih komponenti u mleku (Nielen i sar., 1995).

Procenjuje se da svega 2-3% krava boluje od kliničkog mastitisa, iako je najmanje 40% svih krava inficirano nekim od uzročnika mastitisa (Stojanović i sar., 2001). Na početku eksperimenta kliničkim pregledom je ispitano zdravstveno stanje 50 krava ogledne grupe I i 20 krava ogledne grupe II. Klinički mastitis je uočen kod 18%

krava ogledne grupe I i kod 25% krava ogledne grupe II, pri čemu su one isključene iz eksperimenta. Ovi nalazi su nešto veći u odnosu na rezultate Tolosa i sar. (2015) koji su detektovali klinički mastitis na nivou krava kod 11%, dok je prevalenca kliničkog mastitisa iznosila 26,5% u istraživanjima Lakew i sar. (2009) i 23% u istraživanjima Olde Riekerink i sar. (2008).

U istraživanje su uključene samo krave koje nisu pokazivale znake akutnog mastitisa, odnosno 41 krava ogledne grupe I i 15 krava ogledne grupe II. Tokom perioda zasušenja, najzastupljenije promene na vimenu krava su bile povrede kože i papile vimena (Tabela 12 i 17). Istraživanja Tolosa i sar. (2015) pokazala su da je intramamarna infekcija zastupljenija kod krava sa lezijama i oštećenim papilama, jer je olakšan prodor patogenih uzročnika mastitisa. Intaktna koža papile vimena predstavlja prvu liniju odbrane mlečne žlezde od patogenih bakterija i svako oštećenje narušava njenu protektivnu moć te omogućava lakšu kolonizaciju bakterija povećavajući rizik od nastanka intramamarne infekcije (Boboš i Vidić, 2005; Paduch i sar., 2012). Biffa i sar. (2005) iznose podatak da 68,8% krava sa povredama vimena i papile imaju intramamarnu infekciju.

Nalaz kliničkog pregleda vimena krava tokom perioda rane laktacije je dat u tabelama 15 i 20, iz kojih se može uočiti da je u većem broju slučaja zabeleženo povećano i asimetrično vime sa pojavom crvenila. Posle partusa, intenzivira se proizvodnja mleka koja dostiže maksimum do 10-te nedelje, što može dovesti do povećanja i blagog crvenila vimena (Boboš i Vidić, 2005).

Kod krava ogledne grupe I, zastupljenost nefunkcionalnih papila iznosila je 8,54% (14/164), dok kod krava ogledne grupe II zastupljenost nefunkcionalnih papila je bila nešto manja i iznosila je 8,33% (5/60). Persson Waller i sar. (2014) uočili su manju prevalencu nefunkcionalnih papila vimena koja je iznosila 2,64% tokom post partalnog perioda i 2,8% tokom perioda zasušenja. Najčešća nefunkcionalna papila kod krava ogledne grupe I je pripadala prednjoj četvrti vimena (10/14) (Tabela 13), dok su kod krava ogledne grupe II češće bile nefunkcionalne zadnje papile (4/5) (Tabela 18). U istraživanjima Duraes i sar. (1982) nefunkcionalne papile su najčešće pripadale prednjoj četvrti vimena (28/48), dok Hashemi i sar. (2011) iznose podatak da su zadnje četvrti vimena češće bile nefunkcionalne (48/87). Traume papila (nagazi, ozlede ostrim

predmetima) su najčešći uzroci nefunkcionalnih papila zadnjih četvrti vimena, dok prednje papile postaju nefunkcionalne zbog nepravilnog rada sistema za mužu, jer dolaz do muže na slepo („*blind milking*“) ili se muža nastavlja iako je protok mleka vrlo slab („*overmilking*“). Tokom takve muže povećava se pritisak, odnosno vakum, koji oštećuje tkivo papila vimena koje se ogleda, u početnoj fazi crvenilom i otokom papile, stvaranjem keratinskog prstena oko sisnog otvora, kao i potkožnim krvarenjima (Boboš i Vidić, 2005; Bačić, 2009). Istraživanja su pokazala da nefunkcionalne papile mogu biti jedan od predisponirajućih faktora za nastanak intramamarnih infekcija kod krava i da krave koje poseduju nefunkcionalne papile su češće imale problema sa subkliničkim mastitisom (Persson Waller i sar., 2014).

## 6.2. Bakteriološko ispitivanje mleka krava

Prevalenca subkliničkog mastitisa tokom perioda zasušenja kod krava ogledne grupe I iznosila je 49,33%, pri čemu su najčešće izolovani bili *minor* mastitis patogeni, odnosno bakterije *Corynebacterium* spp. (32,67%) i koagulaza negativne stafilokoke (4,66%). Kontagiozni patogeni identifikovani su u šest (4%) uzoraka mleka (Tabela 14). Posle terapije antimikrobnim lekovima, u periodu rane laktacije, pozitivan bakteriološki nalaz je zabeležen kod 47,3% (35/74) uzoraka mleka, pri čemu su bakterija *Corynebacterium* spp. identifikovane u 40,54% (30/74) pojedinačnih uzoraka mleka krava ogledne grupe I. Koagulaza negativne stafilokoke i kontagiozni patogeni su detektovani samo u jednom pojedinačnom uzorku mleka (1,35%) (Tabela 16).

Kod krava ogledne grupe II tokom perioda predzasušenja, bakterije su izolovane iz 72,73% (40/55) uzoraka mleka. Najzastupljenije bakterije bile su *Corynebacterium* spp. (34,55%) i koagulaza negativne stafilokoke (23,64%), dok je *Staphylococcus aureus* bio izolovan iz pet (9,09%) uzorka mleka (Tabela 19). Tokom perioda zasušenja, primenila se terapija antimikrobnim lekovima i goveđim laktoferinom. Nakon primenjene terapije, bakterije su izolovane iz 40% (16/40) uzoraka mleka. U periodu rane laktacije krava ogledne grupe II kontagiozni patogeni identifikovani kod 5% (2/40) uzoraka mleka, a *Corynebacterium* spp. kod 17,5% (7/40) i koagulaza negativne stafilokoke kod 12,5% (5/40) uzoraka mleka (Tabela 21).

Prevalenca subkliničkog mastitisa iznosila je kod krava ogledne grupe I 49,33% u periodu zasušenja i 47,3% tokom perioda rane laktacije, a kod krava ogledne grupe II 72,73% u periodu predzasušenja i 40% tokom perioda rane laktacije. Nešto veće vrednosti incidence infekcije vimena sa uzročnicima mastitisa zabeležili su Indriss i sar. (2013) tokom 2010 i 2012. godine (73,8%), kao i Ghazi i Niar (2006) koji su uzročnike mastitisa izolovali iz 81,4% uzoraka mleka. Wilson i sar. (1997) su zabeležili 48,5% pozitivnih uzoraka mleka, što odgovara nalazima zastupljenosti subkliničkog mastitisa kod krava ogledne grupe I. Hashemi i sar. (2011) navode kao mogući uzok povećanja prevalencije subkliničkog mastitisa slabu higijenu na farmama krava.

Rezultati istraživanja ukazuju na porast prevalencije infekcije mlečne žlezde sa bakterijama *Corynebacterium* spp. i koagulaza negativnim stafilokokama, što odgovara nalazima Indriss i sar. (2013) i Galfi i sar. (2015b). Indriss i sar. (2013) navode da se tokom poslednjih godina uočava porast infekcije mlečne žlezde krava sa *minor* mastitis patogenima, gde su identifikovani kod 27,18% uzoraka mleka. Galfi i sar. (2015b) su zabeležili nešto veće vrednosti prevalencije infekcije vimena sa bakterijama *Corynebacterium* spp. (38,9%), dok su koagulaza negativne bakterije bile izolovane iz 3,54% uzoraka mleka. Katić (2012) iznosi podatke da se tokom 2011. godine u Republici Srbiji uočava veća učestalost pojave subkliničkih mastitisa izazvanih bakterijama *Staphylococcus aureus* (30,3%) i koagulaza negativnim stafilokokama (28,78%). Povećanje incidence infekcije vimena krava sa koagulaza negativnim stafilokokama može biti povezano sa smanjenjem prevalencije infekcija vimena sa kontagioznim patogenima, kao što su *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus agalactiae* (Pyörälä i Taponen, 2009). Naša istraživanja su ukazala na smanjenje prevalencije intramamarne infekcije sa kontagioznim patogenima, što odgovara nalazima drugih autora koji su kontagiozne patogene detektovali kod 6,33% uzoraka mleka tokom perioda zasušenja, a tokom perioda rane laktacije kod 4,01% uzoraka (Petzer i sar., 2009).

### **6.3. Efikasnost primenjene terapije tokom perioda zasušenja kod krava ogledne grupe I i II**

Period zasušenja mlečne žlezde predstavlja fazu između dve aktivne faze laktacije kada u mlečnoj žlezdi nastaju značajne strukturne i funkcionalne promene

(Jánosi i Huszenicza, 2001; Petzer i sar., 2009). Mlečna žlezda je najviše osetljiva u prve tri nedelje zasušenja, kada je učestalost novih infekcija više puta veća nego u prethodnoj punoj laktaciji (Katić, 2012). Antimikrobna terapija tokom perioda zasušenja („*dry cow therapy*“) komercijalno dostupnim preparatima redukuje pojavu novih infekcija i tako smanjuje mogućnost nastanka kliničkog mastitisa u narednoj laktaciji, a takođe nema gubitaka zbog prisustva rezidua antibiotika i u mleku (Boboš i Vidić, 2001; Bačić, 2012). Katić (2012) iznosi podatak da efektivna terapija antibioticima u periodu zasušenja vimena daje najbolju mogućnost eliminacije postojećih intramamarnih infekcija. Prema istraživanjima mnogih autora, procenat eliminacije postojećih infekcija mlečne žlezde primenom terapije antibioticima u periodu zasušenja iznosi 60-90% (Sol i sar., 1994; Williamson i sar., 1995).

Efikasnost primene antibiotika tokom perioda zasušenja kod krava ogledne grupe I iznosila je 52,7% (Tabela 22). Istraživanja Natzke (1981) su ukazala da primenom efektivnog preparata tokom perioda zasušenja vimena postiže se eliminacija 70-90% svih postojećih infekcija, ali Williamson i sar. (1995) iznose manji uspeh eliminacije infekcija sa patogenima iz okruženja (50-75%). U istraživanju Kai i sar. (2002) efikasnost antibiotske terapije kod stafilokoknog mastitisa tokom perioda zasušenja iznosila je 48,3%. Efikasnost terapije sa antibioticima kod infekcije sa bakterijom *Staphylococcus aureus* je iznosila 100% u istraživanjima Petzer i sar. (2009), što odgovara rezultatima iznetim u ovoj disertaciji. Pored toga, Petzer i sar. (2009) navode da je efikasnost primenjene terapije bila značajno manja kod infekcija sa *minor* mastitis patogenima u odnosu na *major* patogene, što odgovara našim nalazima. Katić (2012) navodi da kod nekih krava ostaju stalno inficirane četvrti ili se javlja klinički oblik mastitisa posle partusa i posle primenjene terapije u zasušenju.

Tokom poslednjih godina, zbog nepravilne i nekontrolisane upotrebe antibiotika, javio se problem povećanja rezistencije bakterija na antimikrobne lekove, što otežava lečenje bolesti, ali ugrožava zdravlje životinja i ljudi (Kutila i sar., 2003; Lacasse i sar., 2008; Bačić, 2012). Saznanja o antimikrobnim sposobnostima laktoferina, dovela su do njegove primene samog ili u kombinaciji sa antibioticima u terapiji i prevenciji mastitisa kod krava (Kai i sar., 2002; Diarra i sar., 2003; Kutila i sar., 2004). Većina istraživanja su rađena u *in vitro* uslovima gde su ispitivali antibakterijsko dejstvo

laktoferina na *major* i *minor* mastitis patogenima. Najefikasniju inhibitornu aktivnost laktoferin je pokazao protiv bakterija *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*, ali je i rast drugih bakterija bio limitiran (Kutila i sar., 2003). Diarra i sar. (2002a, 2002b) navode da kombinovana primena laktoferina i antibiotika u *in vitro* uslovima se pokazala efikasnijom kombinacijom u odnosu na primenu samog laktoferina ili antibiotika. Kawai i sar. (2003) su ukazali na antibakterijsko dejstvo laktoferina u *in vivo* uslovima kod krava sa subkliničkim mastitisom. Prema rezultatima istraživanja ovih autora, laktoferin je ispoljio antibakterijsko dejstvo prema svim izolovanim uzročnicima mastitisa (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, patogeni iz okruženja, koagulaza negativne stafilokoke).

Efikasnost primene goveđeg laktoferina sa antibiotikom tokom perioda zasušenja iznosila je 60% (Tabela 22). Istraživanja Kai i sar. (2002) ukazala su da primena goveđeg laktoferina tokom zasušenja u većem procentu redukuje pojavu mastitisa izazvanog bakterijom *Staphylococcus aureus* posle partusa u odnosu na primenu antibiotika. Izlečenje inficiranih četvrti vimena krava sa laktoferinom objašnjavaju povećanjem koncentracije laktoferina, komponenti komplementa i fagocita. Pored toga, ovi autori navode da intramamarna aplikacija goveđeg laktoferina predstavlja bezbednu metodu za povećanje stepena izlečenja stafilokoknih mastitisa kod krava. Petitclerc i sar. (2007) su ukazali na sinergičan efekat laktoferina i antibiotika tokom intramamarne aplikacije. Ovi autori su došli do zaključka da kombinovana primena (goveđi laktoferin i antibiotik) predstavlja efikasniju terapiju, nego primena samog antibiotika ili laktoferina u cilju eliminacije intramamarne infekcije. Slične rezultate su dobili i drugi autori, koji su ukazali da kombinovana terapija sa laktoferinom i antibiotikom je efikasnija u lečenju stafilokoknog mastitisa tokom perioda zasušenja vimena (Komine i sar., 2006). Prema njihovom istraživanju, efikasnost terapije samo sa antibiotikom ili laktoferinom je bila skoro identična.

Diarra i sar. (2002a, 2002b) navode da se egzogeni laktoferin može primeniti kao korisno sredstvo u tretmanu mastitisa krava tokom perioda involucije mlečne žlezde. Tokom perioda rane involucije mlečne žlezde, koncentracija endogenog laktoferina je niska, tako da aplikacija egzogenog laktoferina bi mogla limitirati metabolizam i rast bakterija. Istraživanja Kutila (2004) i Petitclerc i sar. (2007) su



ukazala da intramamarna primena egzogenog goveđeg laktoferina stimulise mlečnu žlezdu povećavajući broj somatskih ćelija u mleku, pri čemu neutrofilni granulociti oslobađaju iz svojih sekundarnih granula endogeni laktoferin, te se povećava njegova koncentracija u sekretu mlečne žlezde.

#### **6.4. Identifikacija krava sa poremećenom sekrecijom vimena**

Na farmama visokomlečnih krava, u cilju identifikacije krava sa subkliničkim mastitisom i poremećenom sekrecijom vimena, primenjuju se jednostavne i brze metode, kao što su merenje električne otpornosti mleka pomoću Draminski mastitis detektorom i indirektno određivanje broja somatskih ćelija u mleku krava pomoću Kalifornija mastitis testa.

##### **6.4.1. Električna otpornost mleka krava ogledne grupe I**

Merenje električne provodljivosti mleka u cilju detekcije intramamarne infekcije bazira se na promeni koncentracija jona u mleku koja nastaje tokom zapaljenskih procesa. Tokom mastitisa dolazi do povećanja koncentracije jona natrijuma i hlora u mleku što dovodi do povećanja njene električne provodljivosti (Kitchen, 1981). Istovremeno, uočava se pad koncentracije jona kalijuma i laktoze u mleku (Nielen i sar., 1992). Biggadike i sar. (2000) navode da mnogi faktori utiču na električnu provodljivost, kao što su temperatura mleka, pH i koncentracija masti u mleku, period laktacije, starost životinje, muža i estrus.

Kod krava ogledne grupe I za otkrivanje poremećene sekrecije vimena koristila se metoda merenja električne otpornosti mleka pomoću Draminski mastitis detektora. Tokom perioda zasušenja, poremećena sekrecija vimena je uočena kod 72% (108/150) uzoraka mleka, dok je tokom perioda rane laktacije povećana električna provodljivost uočena kod 5,4% (4/74) uzorka mleka (Tabela 23 i Tabela 26). Sličan nalaz iznose Galfi i sar. (2015b) čiji rezultati Draminski mastitis detektora su tokom perioda kasne laktacije ukazali na povećanje incidence subkliničkog mastitisa kod 74,14% uzoraka mleka, dok je u periodu rane laktacije poremećena sekrecija vimena zabeležena kod 5,45% uzoraka.

Tokom perioda zasušenja, Draminski mastitis detektor je ukazao na smanjenju električnu otpornost kod 69,74% uzorka mleka gde nisu izolovane bakterije, dok je kod 25,68% bakteriološki pozitivnih uzoraka bio negativan nalaz Draminski testa (Tabela 24). Ovi nalazi odgovaraju rezultatima drugih autora (Musser i sar., 1998; Ruegg i Reinemann, 2002; Pyörälä, 2003). Validnosti ručnih merača električne provodljivosti mleka u dijagnostici intramamarnih infekcija ispitivali su mnogi autori. Musser i sar. (1998) su izneli podatak da 71% test pozitivnih uzoraka su bili bakteriološki negativni i da su *major* mastitis patogeni bili izolovani iz 11% test negativnih uzoraka mleka, ukazujući na nedostatke merenja električne provodljivosti mleka u cilju detektovanja intramamarnih infekcija.

Prosečne vrednosti električne otpornosti mleka tokom perioda zasušenja prikazane su u tabeli 25, gde se primećuje da su uzorci mleka gde su izolovani *major* mastitis patogeni (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* i *Enterococcus faecium*) imali znatno niže vrednosti električne otpornosti nego uzorci mleka gde nije uočen rast bakterija i uzorci mleka gde su identifikovani *minor* mastitis patogeni. Ovi nalazi se podudaraju sa rezultatima Seguya i Mansell (2000) koji su najmanju električnu otpornost zabeležili u uzorcima mleka inficiranih sa *major* mastitis patogenima. Najvišu prosečnu vrednost električne otpornosti mleka detektovali su u uzorcima mleka inficiranih *minor* mastitis patogenima i iznosila je  $313 \pm 31$  jedinica. Slične vrednosti su dobili i u neinficiranim četvrtima ( $301 \pm 36$  jedinica) objašnjavajući da *minor* mastitis patogeni ne dovode do znatnih oštećenja tkiva mlečne žlezde. Slične podatke iznose i Mansell i Seguya (2003) koji su ispitivali električnu provodljivost mleka krava tokom perioda kasne laktacije sa ciljem identifikacije subkliničkog mastitisa. Langer i sar (2014) objašnjavaju da povećana električna provodljivost mleka, odnosno smanjena električna otpornost mleka u inficiranim četvrtima vimena, nastaje zbog povećanja permeabiliteta kapilara tokom intramamarne infekcije i transporta jona natrijuma, kalijuma i hlora u lumen alveola povećavajući njihovu koncentraciju u mleku.

Tokom perioda rane laktacije, Draminski mastitis test je ukazao na poremećenu sekreciju samo kod 2,86% uzoraka mleka koji su bili bakteriološki pozitivni, dok je kod 97,14% bakteriološki pozitivnih uzoraka, Draminski detektor dao negativan rezultat

(Tabela 27). Prosečne vrednosti električne otpornosti mleka krava tokom perioda rane laktacije su bile visoke ukazujući na odsustvo poremećene sekrecije vimena (Tabela 28). Norberg i sar. (2004) iznose podatak da mastitične krave ne moraju uvek imati povećanu električnu provodljivost mleka u inficiranim četvrtima vimena, ali da varijacije električne provodljivosti u takvim četvrtima je izraženija i veća nego u neinficiranim četvrtima vimena. Merenje električne provodljivosti mleka nailazi na poteškoće kada je u pitanju infekcija vimena sa *minor* mastitis patogenima (Woolford i sar., 1998). Naime, ovi autori su lakše identifikovali intramamarne infekcije sa *major* mastitis patogenima, nego sa *minor* mastitis patogenima objašnjavajući da je uzrok toga što *minor* mastitis patogeni dovode do manjih oštećenja tkiva vimena i inflamacije, kao i to da su infekcijom najčešće zahvaćeni sisni kanal i sisna cisterna. Pored toga, Woolford i sar. (1998) iznose poteškoće tumačenja rezultata merenja električne provodljivosti mleka zbog velikih varijacija njene vrednosti kod neinficiranih četvrti vimena između krava, između četvrti vimena iste krave, kao i između različitog perioda muže iste četvrti vimena. Velika odstupanja električne provodljivosti mleka tokom perioda zasušenja i rane laktacije tumači se fiziološkim povećanjem koncentracije jona hlora u mleku krava kako laktacija odmiče (Linzell i Peaker, 1975).

U tabeli 29 prikazana je senzitivnost i specifičnost Draminski mastitis detektora tokom perioda zasušenja i rane laktacije. Senzitivnost testa u periodu zasušenja je iznosila 74,32%, dok je tokom perioda rane laktacije bila izrazito mala (2,86%). Langer i sar. (2014) su utvrdili isto znatnu nižu vrednost senzitivnosti testa u odnosu na druge autore. U njihovom istraživanju, senzitivnost je iznosila 12,5%, dok su Mansell i Seguya (2003) zabeležili senzitivnost od 51%. Specifičnost testa se isto razlikovala u periodu zasušenja (30,26%) i rane laktacije (92,31%). U istraživanjima Mansell i Seguya (2003) specifičnost testa je iznosila 71%, dok su Nielen i sar. (1992) zabeležili veću specifičnost i iznosila je 94%, što odgovara našem nalazu specifičnosti testa tokom perioda rane laktacije. Pored toga, Langer i sar. (2014) navode da mogućnost detekcije subkliničke forme mastitisa sa Draminski mastitis detektorom je izrazito niska i iznosi 7,6%. Validnost Draminski mastitis testa iznosila je tokom perioda zasušenja 52%, dok je u periodu rane laktacije, ona iznosila 48,65%. Dobijene vrednosti su nešto niže u odnosu na istraživanja Langer i sar. (2014), u čijim istraživanjima validnost Draminski testa je iznosila 59,05%.

#### 6.4.2. Kalifornija mastitis test

Kalifornija mastitis test je prvi put opisan i korišćen 1957. godine (Schalm i Noorlander, 1957) i od tada je prihvaćen kao brza, jednostavna i pouzdana metoda u identifikaciji krava sa poremećenom sekrecijom vimena i subkliničkim mastitisom. Na osnovu rezultata CMT testa, može se indirektno proceniti broj somatskih ćelija u pojedinačnim uzorcima mleka, kao i u zbirnim uzorcima.

Kod krava ogleadne grupe II za otkrivanje poremećene sekrecije vimena primenio se Kalifornija mastitis test. Poremećena sekrecija vimena krava tokom perioda predzasušenja identifikovana je u 58,18% (32/55) četvrti vimena krava, dok je u periodu rane laktacije poremećena sekrecija uočena kod 55% (22/40) četvrti vimena krava (Tabela 30 i Tabela 31). Ovi nalazi odgovaraju rezultatima istraživanja Varatanović i sar. (2010) koji su u 56,1% (128/228) uzoraka mleka uočili pozitivnu reakciju Kalifornija mastitis testa, dok su Sharma i sar. (2010) utvrdili veći procenat CMT pozitivnih četvrti vimena (67,76%).

Tokom perioda predzasušenja, pozitivan rezultat Kalifornija mastitis testa je uočen u 13,33% bakteriološki negativnih četvrti vimena, što je manje u odnosu na vrednost koju su zabeležili Sharma i sar. (2010). U njihovom istraživanju, lažna pozitivna reakcija Kalifornija mastitis testa je uočena u 23,79% četvrti vimena, dok je lažna negativna reakcija detektovana u 25,72% slučajeva što je nešto veće od naših nalaza (22,86%). U istraživanjima Varatanović i sar. (2010) od 102 bakteriološki negativna uzorka, Kalifornija mastitis test je bio pozitivan kod 11 uzoraka mleka, dok od 126 bakteriološki pozitivnih uzoraka mleka, kod 10 uzoraka Kalifornija mastitis test je dao negativnu reakciju. Prema Kalifornija mastitis testu u našem istraživanju, poremećena sekrecija vimena krava tokom perioda rane laktacije uočena je kod pet četvrti vimena (20,83%) gde bakteriološkom analizom mleka nije uočen rast bakterija. Negativna reakcija Kalifornija mastitis testa je uočena kod dva bakteriološki pozitivna uzorka mleka (12,5%).

Senzitivnost Kalifornija mastitis testa tokom perioda pred zasušenje je iznosila 75%, dok je u periodu rane laktacije osetljivost bila 87,5% (Tabela 32). Kalifornija mastitis test se pokazao kao dobar metod za otkrivanje krava sa poremećenom

sekrecijom vimena, kao i sa intramamarnom infekcijom. Sharma i sar. (2010) su utvrdili veću senzitivnost testa (86,07%), dok su Langer i sar. (2014) uočili znatno nižu senzitivnost Kalifornija mastitis testa (60,1%) u odnosu na naša istraživanja. Specifičnost testa je tokom perioda predzasušnja iznosila 86,67%, a tokom perioda rane laktacije 87,5% (Tabela 32). Prema istraživanjima Dingwell i sar. (2004) senzitivnost Kalifornija mastitis testa četiri dana posle partusa je iznosila 82,4%, a specifičnost testa od 80,6%, što ukazuje da se ova metoda može primeniti sa uspehom u detektovanju poremećene sekrecije vimena i subkliničkog mastitisa tokom perioda rane laktacije. Tokom perioda predzasušnja, validnost Kalifornija mastitis testa je iznosila 78,18%, dok je tokom perioda rane laktacije zabeležena veća vrednost (87,5%). Validnost testa prema istraživanjima Langer i sar. (2014) iznosila je 61,56%, Reddy i sar. (2014) 73,33%, dok prema nalazima Sharma i sar. (2015) validnost Kalifornija mastitis testa je iznosila 75,52%.

### **6.5. Broj somatskih ćelija u zbirnim uzorcima mleka krava**

Somatske ćelije u mleku predstavljaju indikator zdravlja vimena krava, kao i higijenske ispravnosti i kvaliteta mleka. Brojni faktori koji su u međusobnoj interakciji utiču na broj somatskih ćelija u mleku, kao što su period laktacije, broj laktacije, odnosno starost životinje, proizvodnja mleka, nepravilna muža, stres, hronične bolesti, kao i mehaničke povrede tkiva vimena (Laevens i sar., 1997; Pyörälä, 2003; Boboš i Vidić, 2005). Najvažniji faktor koji dovodi do povećanja broja somatskih ćelija mleka je intramamarna infekcija.

U tabeli 33 i 34 prikazane su prosečne vrednosti broja somatskih ćelija u zbirnim uzorcima mleka krava ogleadne grupe I tokom perioda zasušenja i rane laktacije. Tokom perioda zasušenja, prosečan broj somatskih ćelija u zbirnom uzorku mleka iznosio je  $632,47 \pm 253,28$  ( $\times 10^3$ ), dok je u periodu rane laktacije uočeno smanjenje broja somatskih ćelija ( $205,87 \pm 139,17$  ( $\times 10^3$ )). Prosečan broj somatskih ćelija u zbirnim uzorcima mleka krava ogleadne grupe II tokom perioda predzasušnja je iznosio  $578,36 \pm 201,38$  ( $\times 10^3$ ), dok u periodu rane laktacije su uočene niže vrednosti (Tabela 35 i Tabela 36). Radinović (2008) iznosi podatak da se broj somatskih ćelija u zbirnim uzorcima mleka krava povećava kako laktacije odmiče, te je tako u prvoj fazi laktacije broj somatskih ćelija iznosio 392 000, a u četvrtoj fazi (poznoj laktaciji) zabeležio

vrednosti broja ćelija od 648 000, što odgovara našim nalazima. Tančin (2013) navodi da su tokom prvog meseca posle partusa vrednosti somatskih ćelija bile veće u odnosu na drugi mesec u kojem je zabeležen pad broja somatskih ćelija, te kako odmiče laktacija, opet dolazi do postepenog povećanja ćelija u mleku gde je tokom desetog meseca laktacije zabeležen najveći broj somatskih ćelija u mleku krava.

## 6.6. Ultrasonografija vimena krava

Ultrasonografija vimena krava, u odnosu na druge metode, kao što su klinički pregled, radiografija i endoskopija, omogućava otkrivanje svih intramamarnih patoloških promena koje mogu predstavljati predispoziciju za nastanak mastitisa (Fasulkov, 2012; Szencziová i Strapák, 2012).

Na slici 33 prikazan je fiziološki parenhim mlečne žlezde, pri čemu se on primećuje kao homogena i ehogena struktura sa anehogenim područjima koja odgovaraju krvnim sudovima i kanalikularnom sistemu parenhima vimena. Karakterističan ultrazvučni izgled parenhima vimena rezultat je prisustva vezivnog tkiva koji poseduje veću ehogenu gustinu i žlezdanog parenhima koji ima manju ehogenu gustinu (Flöck i Winter, 2006). Mleko u mlečnoj cisterni prikazuje se kao anehogena formacija koja može da sadrži male ehogene partikule koje predstavljaju somatske ćelije mleka. Ultrasonografija fiziološke papile vimena prikazana je na slici 34. Sisna cisterna uočava se kao homogena, anehogena struktura okružena tankom hiperehogenom sluzokožom. Vezivnotkivni i mišićni sloj papile vizualizuje se kao homogena hipoehogena struktura. Krvni kapilari mogu se uočiti kao anehogena polja. Koža papile uočava se kao hiperehogena linija promera 1-2 mm. Ovi nalazi odgovaraju istraživanjima drugih autora (Fasulkov, 2012; Galfi i sar., 2015a, 2015d). Istraživanja Franz i sar. (2001) ukazala su da je za ultrazvučnu vizualizaciju sisnog kanala bolje da se primenjuje linearna sonda nego sektorska, kao i metoda „vodenog kupatila“ kako bi se omogućila preciznija vizualizacija slojeva kanala. Sa ultrazvučnom sondom frekvencije 3-5 MHz, sisni kanal se uočava kao hipoehogena zona, jedva ograničena od okolnog tkiva. Prema našim istraživanjima, linearna sonda frekvencije 6-8 MHz pokazala se kao efikasna u diferenciranju slojeva sisnog kanala. *Stratum corneum* sisnog kanala sa keratinom se uočava kao tanka, beličasta, hiperehogena linija, okružena sa paralelnim anehogenim trakama koje predstavljaju *stratum granulosum*, dok se

*stratum lucidum* ne može uočiti. Firstenbergova rozeta uočava se kao homogena, hiperehogena struktura koja se nalazi na prelazu između sisne cisterne i kanala (Franz i sar., 2001; 2009, Szencziová i Strapak, 2012; Galfi i sar., 2015a).

Ultrazvučni nalaz vimena krava sa kliničkim i subkliničkim oblikom mastitisa zavisi od stepena strukturnih promena koje se pojavljuju u tkivu. Zapaljenski procesi u vimenu dovode do promene ehogenosti organa. Parenhim vimena se najčešće uočava kao nehomogena struktura, pri čemu ehogenost može biti smanjena (Slika 38, 39a i b) ili povećana (Slika 35a i b). Trostle i O'Brien (1998) uočili su nehomogenu hipoehogenu strukturu parenhima vimena kod krava sa akutnim mastitisom, dok su povećanje ehogenosti zapazili kod hroničnog mastitisa kao rezultat buljanja fibroznog tkiva. Flöck i Winter (2006) su isto identifikovali krave sa nehomogenim parenhimom smanjene ehogenosti, ali životinje nisu pokazivale znake akutnog mastitisa. Ovi autori navode da nisu uočili korelaciju između trajanja bolesti i stepena sonografskih promena. Istraživanja Galfi i sar. (2015c) ukazala su da se kod krava sa subkliničkim i kliničkim oblikom mastitisa može uočiti povećanje ehogenosti parenhima vimena, pri čemu on postaje nehomogen. Nehomogena struktura parenhima vimena sa nepravilnim anehogenim poljima koji mogu da ukažu na pojavu edema ili hematoma prikazana je na slici 36. Flöck i Winter (2006) navode da se edem vimena karakteriše nepravilnom ehogenošću vezivnog tkiva i pojavom anehogenih polja koji su ispunjeni edematoznim sadržajem, te daju slojeviti izgled, dok se hematoma vizualizuje kao veća anehogena ili hipoehogena struktura okružena sa tankim ehogenim septama. Na slici 37 prikazan je nehomogen parenhim vimena sa izraženim hipoehogenim i hiperehogenim poljima. Hiperehogenost parenhima vimena može se objasniti pojavom fibroze tkiva koja poseduje veću gustinu nego normalni parenhim. Prema istraživanjima drugih autora, ovakav nalaz najčešće odgovara hroničnom mastitisu, gde dolazi do buljanja fibroznog tkiva koji zamenjuje žlezdano tkivo mlečne žlezde (Trostle i O'Brien, 1998). Kotb i sar. (2014) navode da kod fibroze mastičnog vimena dolazi do gubitka sisnog kanala i cisterne, kao i do kompletne zamene žlezdanog parenhima vimena sa hiperehogenim fibroznim tkivom. Pojava višestrukih okruglih hipoehogenih struktura u kojima se mogu uočiti mali hiperehogeni centar u parenhimu vimena prikazana je na slici 39a i b. Flöck i Winter (2006) uočili su slične promene koje su ukazivale na zapaljenje mlečne žlezde bakterijom *Arcanobacterium pyogenes*.

Ultrasonografija vimena krava sa patomorfološkim promenama ukazuje na nepravilne konture sisnog kanala i cisterne sa nemogućnošću raspoznavanja slojeva papilarnog zida (Slika 40a, b, c, i d). Sisna cisterna je neznatno hipoehogena i nepravilnog izgleda. Povećanje ehogenosti sisne cisterne posledica je zapaljenskih procesa u vimenu krava, pri čemu se povećava broj somatskih ćelija mleka. Ovi nalazi odgovaraju istraživanjima drugih autora (Javadi i Acorda, 2011; Kotb i sar., 2014; Galfi i sar., 2015a, 2015d). Prema njihovim rezultatima, tokom kliničke i subkliničke forme mastitisa, moguće je uočiti istanjenost i gubitak troslojnog izgleda papilarnog zida, što odgovara našim nalazima. Pored toga, može doći do kompletne opstrukcije sisnog kanala, kao i nemogućnost vizualizacije Firstenbergove rozete.

Na slici 41 prikazan je fiziološki izgled supramamarnog limfnog čvora, pri čemu se ultrazvučno lako mogu vizualizovati njegove strukture. Kapsula limfnog čvora predstavlja hiperehogenu liniju koja odvaja limfni čvor od okolnog tkiva, dok se parenhim uočava kao homogena, hipoehogena struktura u čijem središnjem delu se nalazi hiperehogeno polje koje odgovara hilusu. Bradley i sar. (2001) i Khoramian i sar. (2015) navode da se tokom zapaljenskih procesa u vimena krava mogu uočiti uvećani supramamarni limfni čvorovi, što odgovara našim nalazima (Slika 42). Dužina fiziološkog limfnog čvora iznosi 3-9 cm, dok širina 1-2 cm, pri čemu veličina limfnog čvora zavisi od starosti životinje, perioda laktacije, broja somatskih ćelija mleka, kao i od zdravstvenog statusa vimena (Bradley i sar., 2001). Khoramian i sar. (2015) navode da je za ultrazvučno određivanje veličine supramamarnih limfnih čvorova poželjnije koristiti sonde manje frekvencije (2-5 MHz) kako bi se vizualizovali celi limfni čvorovi i bili u mogućnosti odrediti njegovu dužinu i širinu. Prema našim istraživanjima, širina limfnog čvora kod krave sa znacima inflamacije vimena iznosila je 3,3 cm, što odgovara nalazima drugih autora (Bradley i sar., 2001; Khoramian i sar., 2015). Pored toga, Bradley i sar. (2001) navode da se strukturne promene limfnog čvora retko mogu zapaziti kod krava sa mastitisom i da samo teška oboljenja, kao što su neoplazme, mogu dovesti do gubitka karakterističnog izgleda limfnog čvora.

## **6.7. Koncentracija imunoglobulina G u mlečnom serumu krava**

Mleko krava sadrži brojne antimikrobne proteine (imunoglobulini, laktoferin, lizozim) koji imaju značajnu ulogu u odbrani mlečne žlezde od uzročnika mastitisa



(Sordillo i sar., 1997). Imunoglobulin G je predominantni imunoglobulin u mleku krava koji ispoljava brojne aktivnosti, kao što su aktivacija komplementa, opsonizacija i aglutinacija bakterija. Sadržaj imunoglobulina u mleku zavisi od stadijuma laktacije i od zdravstvenog statusa mlečne žlezde. Koncentracija imunoglobulina G se povećava tokom perioda kasne laktacije i tokom intramamarnih infekcija (Korhonen i sar., 2000; Król i sar., 2010).

U tabeli 37 i na grafikonu 1 prikazana je koncentracija imunoglobulina G u mlečnom serumu krava ogleadne grupe I tokom perioda zasušenja, dok je u tabeli 38 i na grafikonu 2 prikazana koncentracija imunoglobulina G tokom perioda rane laktacije. Najmanja prosečna vrednost koncentracije imunoglobulina G u mlečnom serumu tokom perioda zasušenja, kao i tokom perioda rane laktacije uočena je kod krava inficiranih sa kontagioznim patogenima. Tokom perioda zasušenja, najveće vrednosti koncentracije imunoglobulina G su zabeležene u uzorcima mleka gde su izolovani *minor* mastitis patogeni, dok je tokom perioda rane laktacije, najviša vrednost uočena u uzorcima mleka gde nije uočen rast bakterija. Tokom perioda zasušenja, najniža koncentracija imunoglobulina G je uočena u uzorcima mleka gde je izolovana bakterija *Staphylococcus aureus* i iznosila je  $12,21 \pm 8,08$  g/L. Ovi nalazi odgovaraju rezultatima istraživanja Kociņa i sar. (2012). U njihovom istraživanju najmanju koncentraciju imunoglobulina G zabeležili su u uzorcima mleka inficiranih sa *Staphylococcus aureus* i iznosila je  $1,35 \pm 0,32$  g/L. U period rane laktacije, u uzorcima mleka inficiranih sa bakterijom *Streptococcus agalactiae* je zabeležena najniža koncentracija imunoglobulina G što odgovara nalazima Boboš i sar. (2014). Prema njihovom istraživanju, veća koncentracija imunoglobulina G je izmerena tokom perioda predzasušenja, nego tokom rane laktacije, kao i veće vrednosti u uzorcima mleka iz neinficiranih četvrti u odnosu na četvrti inficiranih sa patogenima prvog i drugog reda. Galfi i sar. (2015c) su tokom perioda zasušenja zabeležili najveću koncentraciju imunoglobulina G u mlečnom serumu krava sa subkliničkim oblikom mastitisa gde su izolovane koagulaza negativne stafilokoke, što odgovara našim rezultatima (Tabela 37).

Posmatrajući uporedno koncentraciju imunoglobulina G u mlečnom serumu krava tokom perioda zasušenja i rane laktacije, uočava se da su veće vrednosti zabeležene u periodu zasušenja mlečne žlezde što odgovara nalazima drugih autora

(Caffin i sar., 1983; Boboš i Vidić, 2005; Liu i sar., 2009, Boboš i sar., 2014; Galfi i sar., 2015c). Pored perioda laktacije, autori navode da se koncentracija imunoglobulina G povećava tokom intramamarne infekcije, što se slaže sa nalazima tokom perioda zasušenja, ali ne i tokom perioda rane laktacije (Tabela 39, Grafikon 3). Sordillo i sar. (1987) iznose podatak da se koncentracija imunoglobulina G povećava tokom perioda zasušenja dostižući svoj maksimum dve nedelje pre telenja. Isto tako, veću koncentraciju imunoglobulina G uočili su u neinficiranim četvrtima vimena ( $17,86 \pm 1,23$  mg/mL) u odnosu na inficirane četvrti ( $16,15 \pm 1,75$  mg/mL) tokom posmatranog perioda.

Koncentracija imunoglobulina G u mlečnom serumu krava ogledne grupe II tokom perioda predzasušenja prikazana je na grafikonu 4 i tabeli 40, iz kojih se uočava da je najveća koncentracija imunoglobulina G izmerena u uzorcima gde su izolovani kontagiozni i *minor* mastitis patogeni. Isto tako, tokom perioda rane laktacije, najviše vrednosti imunoglobulina G zabeležene su u uzorcima mleka inficiranih kontagioznim i *minor* patogenima (Grafikon 5 i Tabela 41). Ovi nalazi odgovaraju rezultatima istraživanja drugih autora koji navode da se koncentracija imunoglobulina G povećava tokom intramamarne infekcije, kao i da stepen povećanja koncentracije zavisi od patogenosti uzročnika zapaljenja (Rainard i Caffin, 1983; Korhonen i sar., 2000; Kociņa i sar., 2012). Galfi i sar. (2015c) iznose podatke da je koncentracija imunoglobulina G tokom perioda rane laktacije bila viša u bakteriološki pozitivnim uzorcima mlečnog seruma u odnosu na bakteriološki negativne uzorke.

Na grafikonu 6 i u tabeli 42 prikazane su uporedne vrednosti koncentracije imunoglobulina G u mlečnom serumu krava ogledne grupe II tokom perioda predzasušenja i rane laktacije. Uočava se da je koncentracija imunoglobulina G bila viša tokom perioda predzasušenja, ali tokom infekcije vimena sa kontagioznim patogenima u periodu rane laktacije zabeležene su znatno više vrednosti. Tokom perioda predzasušenja i rane laktacije, veće vrednosti imunoglobulina G su izmerene u bakteriološki pozitivnim uzorcima mlečnog seruma u odnosu na bakteriološki negativne uzorke što odgovara nalazima drugih autora (Korhonen i sar., 2000; Galfi i sar., 2015c).

Na grafikonu 7 prikazane su koncentracije imunoglobulina G krava ogledne grupe I i II tokom oba perioda laktacije. Primećuje se da je koncentracija

imunoglobulina G veća u mlečnom serumu krava ogledne grupe I tokom perioda zasušenja gde su identifikovani patogeni iz okruženja i *minor* mastitis patogeni, kao i u uzorcima mleka gde nije uočen rast bakterija. Istraživanja su pokazala da je kod krava ogledne grupe II tokom perioda rane laktacije izmerena znatno veća koncentracija imunoglobulina G u uzorcima gde su detektovani kontagiozni patogeni. Rainard i Caffin (1983) i Korhonen i sar. (2000) navode da vrednosti imunoglobulina u mleku krava značajno zavise od uzročnika zapaljenja mlečne žlezde, kao i od trajanja bolesti. Tokom akutnog zapaljenja vimena, koncentracija imunoglobulina znatno raste, ali kod hroničnih oblika bolesti, pa čak i kod infekcije sa bakterijom *Staphylococcus aureus*, ne može se uočiti značajno povećanje nivoa imunoglobulina u mleku (Doymaz i sar., 1988).

### **6.8. Koncentracija laktoferina u mleku krava**

Laktoferin, kao antimikrobni glikoprotein, igra važnu ulogu u odbrani mlečne žlezde od egzogenih i endogenih infekcija. Na koncentraciju laktoferina u mleku krava utiču mnogi faktori, kao što su period laktacije, proizvodnja mleka, zdravstveni status vimena (Chang i sar., 2008).

Na grafikonu 8 i u tabeli 43 prikazana je koncentracija laktoferina u mleku krava ogledne grupe I tokom perioda zasušenja. U uzorcima mleka gde su identifikovane bakterije *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus agalactiae* izmerene su znatno više vrednosti laktoferina u odnosu na uzorke mleka gde su izolovane bakterije *Corynebacterium* spp. i koagulaza negativne stafilokoke. Ovi nalazi odgovaraju rezultatima drugih autora koji navode da *major* mastitis patogeni signifikantno povećavaju koncentraciju laktoferina u mleku (Harmon i sar., 1975; Hagiwara i sar., 2003; Newman i sar., 2009; Chaneton i sar., 2013). Hagiwara i sar. (2003) zapazili su najvišu koncentraciju laktoferina u uzorcima mleka gde su identifikovane bakterije *Streptococcus agalactiae*, što odgovara našim nalazima. Pored toga, drugi autori navode da na koncentraciju laktoferina može uticati patogenost uzročnika mastitisa (Kawai i sar., 1999; Hagiwara i sar., 2003). Komine i sar. (2005) uočili su da je koncentracija laktoferina kod krava u laktaciji veća do sedam puta tokom hroničnog mastitisa u odnosu na zdrave jedinke, a kod akutnog mastitisa i do trinaest puta. Tokom inflamatornog procesa u vimenu, stimulišu se epitelne ćelije mlečne žlezde koje

povećavaju produkciju laktoferina, a pored toga, sekretorne granule neutrofila oslobađaju laktoferin (Lash i sar., 1983; Kutila i sar., 2004).

Prema istraživanjima Welty i sar. (1976) koncentracija laktoferina se na početku zasušenja kreće od 0,04 mg/mL do 0,73 mg/mL, pri čemu svoj maksimum dostiže tokom treće i četvrte nedelje involucije (20-30 mg/mL). Ovi autori zabeležili su najvišu fiziološku koncentraciju laktoferina tokom involucije mlečne žlezde koja je iznosila 118,5 mg/mL.

Koncentracija laktoferina u mleku krava ogledne grupe I tokom perioda rane laktacije prikazana je na grafikonu 9 i u tabeli 44. Tokom ovog perioda uočava se da su visoke vrednosti laktoferina izmerene u uzorcima mleka gde nije uočen rast bakterija, kao i u uzorcima gde su izolovani patogeni iz okruženja, ali da je koncentracija laktoferina bila znatno manja u uzorcima mleka gde su identifikovani kontagiozni i *minor* mastitis patogeni. Sordillo i sar. (1988) uočili su značajno niže koncentracije laktoferina u uzorcima mleka koji potiču iz četvrti vimena inficiranih sa *major* mastitis patogenima u odnosu na uzorke mleka gde su izolovani *minor* mastitis patogeni i uzorke gde nije uočen rast bakterija.

Uporedni prikaz koncentracije laktoferina u mleku krava ogledne grupe I tokom oba perioda dat je na grafikonu 10 i u tabeli 45. Može se primetiti da faza laktacije znatno utiče na koncentraciju laktoferina u mleku, pošto su veće vrednosti zabeležene tokom perioda zasušenja, što odgovara nalazima drugih autora (Welty i sar., 1976; Gaunt i sar., 1980; Cheng i sar., 2008). Pored perioda zasušenja, visoke koncentracije laktoferina se mogu uočiti i u kolostrumu. Sánchez i sar. (1988) su zabeležili najveću koncentraciju laktoferina tokom prve muže posle partusa (0,83 mg/mL), koja naglo pada tokom prvih dana laktacije, pri čemu su definitivne vrednosti laktoferina dostignute u trećoj nedelji laktacije i iznosile su 0,09 mg/mL. Tokom perioda zasušenja vrednosti laktoferina, u našem istraživanju, su se kretale od 0,7267 mg/mL do 9,8413 mg/mL, dok su se tokom perioda rane laktacije vrednosti laktoferina kretale od 0,0015 mg/mL do 5,9392 mg/mL. Mleko krava u laktaciji sadrži relativno male količine laktoferina, čija koncentracija varira od 0,02-0,35 mg/mL (Schanbacher i sar., 1993). Hagiwara i sar. (2003) i Newman i sar. (2009) navode da je koncentracija laktoferina viša u bakteriološki pozitivnim uzorcima mleka, što odgovara našim nalazima tokom

perioda zasušenja, ali ne i tokom perioda rane laktacije. Suprotno, Sordillo i sar. (1988) uočili su niže vrednosti laktoferina u bakteriološki pozitivnim uzorcima u odnosu na bakteriološki negativne uzorke, navodeći da niža koncentracija laktoferina doprinosi smanjenju odbrambenog mehanizma mlečne žlezde što rezultira nastanku novih infekcija.

Koncentracija laktoferina u mleku krava ogledne grupe II tokom perioda predzasušenja prikazana je na grafikonu 11 i u tabeli 46. Istraživanja Bushe i Oliver (1987) ukazala su da se koncentracija laktoferina kretala od 0,4 mg/mL do 1,05 mg/mL tokom nedelju dana pred zasušenje, odnosno da se krajem laktacije uočava povećanje koncentracije laktoferina u odnosu na period srednje laktacije. Isto tako, Newman i sar. (2009) uočili su nešto niže vrednosti laktoferina (0,62 mg/mL) nedelju dana pred zasušenje, nego na dan zasušenja (1,1 mg/mL). U našim istraživanjima, tokom perioda predzasušenja, vrednosti laktoferina su se kretale od 0,033 mg/mL do 4,9884 mg/mL. Znatno veća koncentracija laktoferina je izmerena u uzorcima mleka gde su izolovani kontagiozni patogeni što odgovara navodima drugih autora (Kawai i sar., 1999; Hagiwara i sar., 2003; Newman i sar., 2009).

Na grafikonu 12 i u tabeli 47 data je koncentracija laktoferina u mleku krava ogledne grupe II tokom perioda rane laktacije. Najmanja vrednost je zabeležena u uzorcima mleka gde nije uočen rast bakterija (0,0216 mg/mL), dok su znatno veće koncentracije uočene u uzorcima mleka gde su izolovane bakterije *Staphylococcus aureus* (5,5259 mg/mL) i koagulaza negativne stafilokoke (4,6347 mg/mL), što odgovara rezultatima istraživanja drugih autora (Harmon i sar., 1975; Kawai i sar., 1999; Hagiwara i sar., 2003, Newman i sar., 2009).

Uporedni prikaz nalaza koncentracije laktoferina u mleku krava ogledne grupe II tokom oba perioda laktacije data je na grafikonu 13 i u tabeli 48 iz kojih se može uočiti da je koncentracija laktoferina viša tokom perioda predzasušenja u odnosu na period rane laktacije i u uzorcima mleka sa pozitivnim bakteriološkim nalazom u odnosu na uzorke gde nije uočen rast bakterija. Ovi nalazi odgovaraju rezultatima mnogih autora (Harmon i sar., 1975; Welty i sar., 1976; Schanbacher i sar., 1993; Kawai i sar., 1999; Hagiwara i sar., 2003; Newman i sar. 2009; Chaneton i sar., 2013).

Na grafikonu 14 prikazana je koncentracija laktoferina u mleku krava ogledne grupe I i II tokom oba perioda laktacije. Može se uočiti da je koncentracija laktoferina u mleku krava ogledne grupe II gde su identifikovani kontagiozni i *minor* mastitis patogeni bila znatno veća nego kod krava ogledne grupe I tokom perioda rane laktacije.

### **6.9. Odnos koncentracije imunoglobulina G i laktoferina u mleku krava**

Rezultati testa korelacije koncentracije imunoglobulina G i laktoferina u mleku krava ogledne grupe I prikazana je u tabeli 49. Zapaža se pozitivna korelacija između koncentracije ova dva proteina, što ukazuje da sa povećanjem koncentracije imunoglobulina G, povećava se i koncentracija laktoferina. Signifikantna i pozitivna korelacija između koncentracije imunoglobulina G i laktoferina uočena je i kod krava ogledne grupe II tokom oba perioda laktacije (Tabela 50). Ovi nalazi odgovaraju rezultatima drugih autora (Fleming i sar., 2014). Negativna korelacija je uočena kod uzoraka mleka krava ogledne grupe I gde su identifikovani *major* mastitis patogeni, što može da ukaže na supresiju lokalnog odbrambenog sistema mlečne žlezde.

## 7. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobijenih u okviru ove doktorske disertacije izvedeni su sledeći zaključci:

1. Najčešće izolovani *major* mastitis patogeni iz uzoraka mleka krava u ogledu bile su bakterije *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus agalactiae*
2. *Minor* mastitis patogeni (*Corynebacterium* spp. i koagulaza negativne stafilokoke) su najčešće izolovane bakterije iz pojedinačnih uzoraka mleka krava ogledne grupe I i II.
3. Kalifornija mastitis test pokazao je veću senzitivnost i specifičnost u odnosu na Draminski mastitis test u postupku detekcije poremećene sekrecije vimena i subkliničkog mastitisa.
4. Ultrasonografija mlečne žlezde krava pruža korisne informacije o zdravstvenom stanju vimena omogućavajući identifikaciju krava sa patološkim promenama kako u parenhimu, tako i u papili vimena, što se može potvrditi bakteriološkim nalazom tokom laktacije. Pored toga, pokazala se kao efikasna metoda u dijagnostici poremećene sekrecije vimena i mastitisa kod krava tokom perioda zasušenja kada bakteriološke analize nisu preporučljive.

5. Veće vrednosti koncentracije imunoglobulina G u mlečnom serumu krava uočene su tokom perioda predzasušnja i zasušenja, u odnosu na period rane laktacije.
6. Najviša koncentracija laktoferina izmerena je u mleku krava ogledne grupe I tokom perioda zasušenja.
7. Najveći uticaj na porast koncentracije laktoferina u mleku krava imali su bakterijski uzročnici mastitisa.
8. Efikasnost antibiotske terapije primenjene tokom perioda zasušenja kod krava ogledne grupe I iznosila je 52,7%, dok je efikasnost primenjene terapije goveđim laktoferinom i antibiotikom kod krava ogledne grupe II iznosila 60%.
9. Aplikacija laktoferina tokom perioda zasušenja doprinela je efikasnosti terapije intramamarnih infekcija, ali nije imala uticaj na koncentraciju laktoferina u mleku tokom perioda rane laktacije.

Dalja istraživanja su neophodna kako bi se u potpunosti potvrdila efikasnost intramamarne terapije goveđim laktoferinom i antibiotikom u cilju eliminacije uzročnika mastitisa i da se odredi terapijska koncentracija laktoferina.



## 8. LITERATURA

1. Aisen D. T., Liebman A.: Lactoferrin and transferrin: A comparative study. *Biochimica et Biophysica Acta*. 257(2): 314-23. 1972
2. Akers R. M.: Lactation and the mammary gland. Blackwell publishing professional. 2002.
3. Alacam, D., Dinc A., Güler M., Elma E.: Incidence and radiographic examination of different pathological findings in the teat of dairy cows. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*. 97, 523-5. 1990.
4. Alvin, F. W.: The bovine mammary gland-structure and function. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 11, 1133-6, Shaumburg, 1977.
5. Anderson B. F., Baker H. M., Dodson E. J., Norris G. E., Rumball S. V., Waters J. M., Baker E. N.: Structure of human lactoferrin at 3.2- Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.* 84: 1769-73. 1987.
6. Arnold R. R., Brewer M., Gauthier J. J.: Bacteriocidal activity of human lactoferrin: Sensitivity of a variety of microorganisms. *Infection and Immunity*. 28(3): 893-8. 1980.
7. Arnold R. R., Russell J. E., Champion W. J., Brewer M., Gauthier J. J.: Bacteriocidal activity of human lactoferrin: Differentiation from the stasis of iron deprivation. *Infection and Immunity*. 35(3): 792-9. 1982.
8. Artym J.: Role of lactoferrin in iron administration in the organism. Part II. Antimicrobial and anti-inflammatory action by an iron sequestration. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. 64: 604-16. 2010.
9. Avdić, R., Arnautović I., Pobrić H., Tandir F.: Dužina sisnog kanala u odnosu na oblik vrha papile. *Veterinaria*. 57(1-2): 44-54. 2008.
10. Avdić, R.: Morfološke karakteristike Fürstenbergove rozete i sisnog kanala kod krava. *Veterinaria*. 56(1-2): 7-16. 2007.
11. Ayadi M., Caja G., Such X., Knight C. H.: Use of ultrasonography to estimate cistern size and milk storage at different milking intervals in the udder of dairy cows. *Journal of Dairy Research*. 70(1): 1-7. 2003.
12. Bačić G.: Dijagnostika i liječenje mastitisa u goveda. Veterinarski fakultet, Zagreb. 2009.

13. Bačić G.: Dijagnostika i terapija kliničkih mastitisa. Zbornik radova 23. Savetovanje veterinarara Srbije. 13-16. Septembar 2012. Zlatibor. pp: 107-13. 2012.
14. Baker E. N.: Lactoferrin: A multi-tasking protein par excellence. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 62(22): 2529-30. 2005.
15. Baker H. M., Baker E. N.: Lactoferrin and iron: Structural and dynamic aspects of binding and release. *BioMetals*. 17: 209-16. 2004.
16. Baker E. N., Baker H. M.: Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 62(22): 2531-9. 2005.
17. Bath, D. L., Dickinson F. N., Tucker H. A., Appleman R. D.: Dairy cattle: principles, practices, problems, profits. 3rd ed. Lea &Febiger, Philadelphia. PA; 1985.
18. Beddek A. J., Schryvers A. B.: The lactoferrin receptor complex in gram negative bacteria. *BioMetals*. 23(3): 377-86. 2010.
19. Bellamy W., Takase M., Wakabayashi H., Kawase K., Tomita M.: Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from N-terminal region of bovine lactoferrin. *Journal of Applied Bacteriology*. 73(6): 472-9. 1992.
20. Bellamy W., Wakabayashi H., Takase M., Kawase K., Shimamura S., Tomita M.: Killing of *Candida albicans* by lactoferricin B, a potent antimicrobial peptide derived from N-terminal region of bovine lactoferrin. *Medical Microbiology and Immunology*. 182(2): 97-105. 1993.
21. Berluti F., Pantanella F., Natalizi T., Frioni A., Paesano R., Polimeni A., Valenti P.: Antiviral properties of lactoferrin - a natural immunity molecule. *Molecules*. 16(8): 6992-7018. 2011.
22. Bezwoda W. R., Mansoor N.: Lactoferrin from human breast milk and from neutrophil granulocytes. Comparative studies of isolation, quantitation, characterization and iron binding properties. *Biomedical Chromatography*. 3(3):121-6. 1989.
23. Biffa D., Debela E., Beyene F.: Prevalence and risk factors of mastitis in lactating dairy cows in Southern Ethiopia. *The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*. 3(3): 189-98. 2005.
24. Biggadike H., Ohnstad I., Hillerton E.: A practical evaluation of milk conductivity measurements. *Proceedings of British Mastitis Conference*. 56-61. 2000.
25. Biserte G., Havez R., Cuvelier R.: Les glycoprotéides des sécrétions bronchiques. *Exposés annuels de biochimie médicale*. 25:85-120. 1963.
26. Bishop J. G., Schanbacher F. L., Ferguson L. C., Smith K. L.: In vitro growth inhibition of mastitis-causing coliform bacteria by bovine apo-lactoferrin and reversal of inhibition by citrate and high concentration of apo-lactoferrin. *Infection and Immunity*. 14(4): 911-8. 1976.
27. Blowey R. W., Weaver A. D.: Udder and teat disorders. Color atlas of diseases and disorders of cattle. Mosby, Elsevier. 203-19. 2011.
28. Boboš S., Vidić B.: Preventiva i terapija mastitisa. Srpsko veterinarsko društvo. Zbornik radova. Vrnjačka Banja 30. maj-2. jun 2001. pp: 61-6. 2001.
29. Boboš S., Vidić B.: Mlečna žlezda preživara. Morfologija – patologija – terapija. Novi Sad. 2005.

30. Boboš S., Pajić M., Radinović M., Mihajlović Ukropina M., Rašić Z., Galfi A.: Primena mera kontrole poremećaja sekrecije vimena i suzbijanje mastitisa krava. Zbornik radova 23. Savetovanje veterinara Srbije. 13-16. Septembar 2012. Zlatibor. pp: 115-20. 2012.
31. Boboš F. S., Galfi L. A., Radinović M. Ž., Pajić J. M., Mašić S. Z.: Effect of lactation stage and bacteriological findings on Ig G concentration in milk serum of cows. *Veterinary Medicine- Kharkiv, Ukraine*. 99: 93-5. 2014.
32. Bortner C. A., Arnold R. R., Miller R. D.: Bacteriocidal effect of lactoferrin on *Legionella pneumophila*: effect of the physiological state of the organism. *Canadian Journal of Microbiology*. 35(11): 1048-51. 1989.
33. Bradley K. J., Bradley A. J., Barr F. J.: Ultrasonographic appearance of the superficial supramammary lymph nodes in lactating dairy cattle. *Veterinary Record*. 148(16): 497-501. 2001.
34. Bruckmaier, R. M., Blum, J. W.: Oxytocin release and milk removal in ruminants. *Journal of Dairy Science*. 81(4): 939-49. 1998.
35. Bullen J. J., Rogers H. J., Leigh L.: Iron-binding proteins in milk and resistance to *Echerichia coli* infection in infants. *British Medical Journal*. 1(5792): 69-75. 1972.
36. Bullen J. J., Rogers H. J., Spalding P. B., Ward C. G.: Iron and infection: The heart of the matter. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 43(3): 325-30. 2005.
37. Bushe T., Oliver S. P.: Natural protective factors in bovine mammary secretions following different methods of milk cessation. *Journal of Dairy Science*. 70(3): 696-704. 1987.
38. Butler J. E.: Synthesis and distribution of immunoglobulins. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 163: 795-8. 1973.
39. Caffin J. P., Poutrel B, Rainard P.: Physiological and pathological factors influencing bovine immunoglobulin G<sub>1</sub> concentration in milk. *Journal of Dairy Science*. 66(10): 2161-6. 1983.
40. Cartee R. E., Ibrahim A. K., McLeary D.: B-mode ultrasonography of the bovine udder and teat. *Journal of American Veterinary Medical Association*. 188(11): 1284-7. 1986.
41. Caruolo E. V., Mochrie R. D.: Ultrasonograms of lactating mammary gland. *Journal of Dairy Science*. 50(2): 225-30. 1967.
42. Cassat J. E., Skaar E. P.: Iron in infection and immunity. *Cell Host & Microbe*. 13(5): 509-19. 2013.
43. Chaneton L., Bontá M., Pol M., Tirante L., Bussmann L. E.: Milk lactoferrin in heifers: Influence of health status and stage of lactation. *Journal of Dairy Science*. 96(8): 4977-82. 2013
44. Cheng J. B., Wang J. Q., Bu D. P., Liu G. L., Zhang C. G., Wei H. Y., Zhou L. Y., Wang J. Z.: Factors affecting the lactoferrin concentration in bovine milk. *Journal of Dairy Science*. 91(3): 970-6. 2008.
45. Cherayil B. J.: The role of iron in the immune response to bacterial infection. *Immunologic Research*. 50(1): 1-9. 2011.
46. Conesa C., Sanchez L., Rota C., Perez M. D., Calvo M., Farnaud S., Evans R. W.: Isolation of lactoferrin from milk of different species: Calorimetric and antimicrobial studies. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 150(1): 131-9. 2008.

47. Conneely O. M.: Antiinflammatory activities of lactoferrin. *Journal of the American Collage of Nutrition*. 20(5): 389S-95S. 2001.
48. Coughlin R. T., Tonsager S., McGroarty E. J.: Quantitation of metal cation bound to membranes and extracted lipopolysaccharide of *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 22(8): 2002-7. 1983.
49. Crouch S. P., Slater K. J., Fletcher J.: Regulation of cytokine release from mononuclear cells by the iron-binding protein lactoferrin. *Blood*. 80(1): 235-40. 1992.
50. De Haas Y., Veerkamp R. F., Barkema H. W., Grohn Y. T., Schukken Y. H.: Associations between pathogen-specific case of clinical mastitis and somatic cell count patterns. *Journal of Dairy Science*. 87(1): 95-105. 2004.
51. Diarra M. S., Petitclerc D., Lacasse P.: Response of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis to exogenous iron sources. *Journal of Dairy Science*. 85(9): 2141-8. 2002a.
52. Diarra M. S., Petitclerc D., Lacasse P.: Effect of lactoferrin in combination with penicillin on the morphology and the physiology of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*. 85(5): 1141-9. 2002b.
53. Diarra M. S., Petitclerc D., Deschênes É., Lassard N., Grondin G., Talbot B., Lacasse P.: Lactoferrin alone or in combination with penicillin G on bovine polymorphonuclear function and mammary epithelial cells colonization by *Staphylococcus aureus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 95(1-2): 33-42. 2003.
54. Dinç D. A., Şendağ S., Aydın I.: Diagnosis of teat stenosis in dairy cattle by real-time ultrasonography. *Veterinary Record*. 147(10): 270-2. 2000.
55. Dingwell R., Leslie K., Timms L. L., Schukken Y., Sargent J.: Evaluation of the California mastitis test to determine udder health status of early lactation dairy cows. *Animal Industry Report*. AS 650, ASL R1913. 2004.  
[http://lib.dr.iastate.edu/ans\\_air/vol650/iss1/72](http://lib.dr.iastate.edu/ans_air/vol650/iss1/72)
56. Doymaz M. Z., Sordillo L. M., Oliver S. P., Guidry A. J.: Effect of *S. aureus* on bovine mammary gland plasma cell populations and immunoglobulin concentration in milk. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 21(1): 87-93. 1988.
57. Duke H. H.: Physiology of domestic animals. 11th ed. M.J. Swenson, W. O. Reece Editors. Cornell University Press. Ithaca and London, 1993.
58. Duraes M. C., Wilcox C. J., Head H. H., van Horn H. H.: Frequency and effect on production of blind quarters in first lactation dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 65(9): 1804-7. 1982.
59. Dzitko K., Dziadek B., Dziadek J., Długońska H.: *Toxoplasma gondii*: Inhibition of the intracellular growth by human lactoferrin. *Polish Journal of Microbiology*. 56(1): 25-32. 2007.
60. El-Loly M. M., Mahfouz M. B.: Lactoferrin in relation to biological functions and applications: A review. *International Journal of Dairy Science*. 6(2): 79-111. 2011.
61. Ellison R. T. 3<sup>rd</sup>., Giehl T. J., LaForce F. M.: Damage of the membrane of enteric Gram-negative bacteria by lactoferrin and transferring. *Infection and Immunity*. 56(11): 2774-81. 1988.

62. Ellison R. T. 3<sup>rd</sup>., LaForce F. M., Giehl T. J., Boose D. S., Dunn B. E.: Lactoferrin and transferring damage of the Gram-negative outer membrane is modulated by Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>. *Journal of General Microbiology*. 136(7): 1437-46. 1990.
63. Elsayy A., Almehdar H., Redwan E. M.: Biofilm formation inhibition of multidrug-resistant of clinical isolates *Pseudomonas aeruginosa* by lactoferrin. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 7(1): 129-32. 2011.
64. Erdei J., Forsgren A., Naidu A. S.: Lactoferrin binds to porins OmpF and OmpC in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 62(4): 1236-40. 1994.
65. Esposito J. J., Obljeski J. F.: Enterovirus type 70 virion and intracellular proteins. *Journal of Virology*. 18(3): 1160-2. 1976.
66. Farnaud S., Evans R. W.: Lactoferrin- a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Molecular Immunology*. 40(7): 395-405. 2003.
67. Fasulkov I. R.: Ultrasonography of the mammary gland in ruminants: a review. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. 15(1): 1-12. 2012.
68. Fasulkov I., Karadaev M., Vasilev N., Simeonov R., Urumova V., Mladenova E.: Ultrasound and histopathological investigations of experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis in goats. *Small Ruminant Research*. 129: 114-20. 2015.
69. Faulkner A., Peaker M.: Reviews of the progress of dairy science: Secretion of citrate into milk. *Journal of Dairy Research*. 49(1): 159-69. 1982.
70. Fleming K., Thompson-Crispi K.A., Hodgins D.C., Miglior F. & Mallard B.A.: Variation of lactoferrin and total immunoglobulin G concentration in colostrums from Canadian Holstein dairy cattle classified as high, average or low immune responders. *Proceedings of the 10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production* (Vancouver, Canada). 2014. [https://asas.org/docs/default-source/wegalp-posters/529\\_paper\\_9141\\_manuscript\\_444\\_0.pdf?sfvrsn=2](https://asas.org/docs/default-source/wegalp-posters/529_paper_9141_manuscript_444_0.pdf?sfvrsn=2)
71. Flöck M., Winter P.: Diagnostic ultrasonography in cattle with disease of the mammary gland. *The Veterinary Journal*. 171: 314-21. 2006.
72. Florian P. E., Moisei M., Trif M., Evans R. W., Roseanu A.: Anti-inflammatory and anti-tumoral activity of human recombinant lactoferrin. *Romanian Journal of Biochemistry*. 49(2): 163-71. 2012.
73. Fosgate G. T., Petzer I. M., Karzis J.: Sensitivity and specificity of a hand-held milk electrical conductivity meter compared to the Californija mastitis test for mastitis in dairy cattle. *The Veterinary Journal*. 196(1): 98-102. 2013.
74. Frandson R. D., Wilke L. W., Fails A. D.: Anatomy and physiology of farm animals. 7th ed. Wiley- Blackwell, 2009. ISBN: 978-0-8138-1394-3
75. Franz S., Hofmann-Parisot M., Baumgartner W., Windischbauer G., Suchy A., Bauder B. Ultrasonography of the teat canal in cows and sheeps. *Veterinary Record*. 149(4): 109-12. 2001.
76. Franz S., Floek M., Hofmann-Parisot M.: Ultrasonography of the bovine udder and teat. *Veterinary Clinic of North America. Food Animal Practice*. 25(3): 669-85. 2009.
77. Galfi A., Radinović M., Davidov I., Govorčin M., Petrović K.: Ultrasonografija vimena visokomlečnih krava. *Letopis naučnih radova Poljoprivrednog fakulteta*. 39(1): 72-78. 2015a.

78. Galfi A., Radinović M., Milanov D., Boboš S., Pajić M., Savić S., Davidov I.: Electrical conductivity of milk and bacteriological findings in cows with subclinical mastitis. *Biotechnology in Animal Husbandry*. 31(4): 533-41. 2015b.
79. Galfi A., Radinović M., Pajić M., Boboš S., Vidić B., Savić S., Milanov D.: Immunoglobulin G concentration and ultrasonography of the cows udder with subclinical mastitis. International Symposium of Veterinary Medicine "One Health - New Challenges" (ISVM2015). 21-23. May 2015. Vrdnik, Serbia. pp: 489-92. 2015c.
80. Galfi A., Radinović M., Govorčin M., Petrović K., Pajić M., Boboš S.: Ultrazvučni prikaz papile vimena visokomlečnih krava. Zbornik radova 26. Savetovanje veterinara Srbije. 10-13. Septembar 2015. Zlatibor. pp: 195-8. 2015d.
81. Gapper L. W., Copestake D. E. J., Otter D. E., Indyk H. E.: Analysis of bovine immunoglobulin G in milk, colostrums and dietary supplements: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 389(1): 93-109. 2007.
82. Garcia-Mantoya I. A., Cendon T. S., Arevalo-Gallegos S., Rascon-Cruz Q.: Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview. *Biochemica et Biophysica Acta*. 1820(3): 226-36. 2012.
83. Gaunt S. N., Raffio N., Kingsbury E. T., Damon Jr R. A., Johnson W. H., Mitchell B. A.: Variation of lactoferrin and mastitis and their heritabilities. *Journal of Dairy Science*. 63(11): 1874-80. 1980.
84. George L. W., Divers T. J., Ducharme N., Welcome F. L.: Diseases of the teats and udder. Rebhun's diseases of dairy cattle. Saunders Elsevier. 327-94. 2008.
85. Ghazi k., Niar A.: Incidence of mastitis in various bovine breedings in Tiaret area (Algeria). *Assiut Veterinary Medical Journal*. 52: 198-206. 2006.
86. Gifford J. L., Hunter H. N., Vogel H. J.: Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 62(22): 2588-98. 2005.
87. Goldsmith S. J., Eitenmiller R. R., Barnhart H. M., Toledo R. T., Rao V. N.: Unsaturated iron-binding capacity of human milk. *Journal of Food Science*. 47(4): 1298-304. 1982.
88. González-Chávez S. A., Árevalo-Gallegos S., Rascón-Cruz Q.: Lactoferrin: structure, function and application. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 33: 301.e1-301.e8. 2009.
89. Green M. J., Green L. E., Schukken Y. H., Bradley A. J., Peeler E. J., Barkema H. W., de Haas Y., Collins V. J., Medley G. F.: Somatic cell count distribution during lactation predict clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*. 87(5): 1256-64. 2004.
90. Hagiwara S., Kawai K., Anri A., Nagahata H.: Lactoferrin concentration in milk from normal and subclinical mastitic cows. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 65(3): 319-23. 2003.
91. Hagnestam-Nielsen C., Emanuelson U., Berglund B., Strandberg E.: Relationship between somatic cell count and milk yield in different stage of lactation. *Journal of Dairy Science*. 92(7): 3124-33. 2009.
92. Hallowell G. D.: Ultrasound of the bovine mammary gland and its role in mastitis control. *International Dairy Topics*. 11(5): 41-2. 2012.

93. Hamann J., Mein G. A.: Responses of the bovine teat to machine milking: Measurement of changes in thickness of the teat apex. *Journal of Dairy Research*. 55: 331-8. 1988.
94. Hamann J., Osteras O., Mayntz M., Woyke W.: Functional parameters of milking units with regard to teat tissue treatment. *Bulletin of the International Dairy Federation*. 297: 23-34. 1994.
95. Hamann J.: Somatic cells: factors of influence and practical measures to keep a physiological level. *Mastitis Newsletter. Newsletter of the International Dairy Federation*. 144(21): 9-11. 1996.
96. Harmon R. J., Schanbacher F. L., Ferguson L. C., Smith K. L.: Concentration of lactoferrin in milk of normal lactating cows and changes occurring during mastitis. *American Journal of Veterinary Research*. 36(7): 1001-7. 1975.
97. Harmon R. J., Newbould F. H. S.: Neutrophil leukocyte as a source of lactoferrin in bovine milk. *American Journal of Veterinary Research*. 41(10): 1603-6. 1980.
98. Hashemi M., Kafi M., Safdarian M.: The prevalence of clinical and subclinical mastitis in dairy cows in the central region of Fars province, south of Iran. *Iran Journal of Veterinary Research*. 12(3): 236-41 2011.
99. Hibbitt K. G., Cole C. B., Reiter B.: Antimicrobial proteins isolated from the teat canal of the cow. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 56: 365-71. 1969.
100. Hillerton J. E., Halley B. I., Neaves P., Rose M. D.: Detection of antimicrobial substances in individual cow and quarter milk samples using Delvotest microbial inhibitor tests. *Journal of Dairy Science*. 82(4): 704-11. 1999.
101. Hiroyuki K., Tomoko E., Tetsuya M.: Inhibitory effects of lactoferrin on biofilm formation in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 18(1): 47-52. 2012.
102. Homan J. E., Wattiaux M. A.: Lactation and milking. Volumen 3 of Technical dairy guide. University of Wisconsin- Madison, Babcock Institute for International Dairy Research and Development. 1995.
103. Hovey R. C., Trott J. F., Vonderhaar B. K.: Establishing a framework for the functional mammary gland from endocrinology to morphology. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 7: 17-38. 2002.
104. Hurley W. L.: Lactation biology, College of agricultural consumer and environmental science, University of Illinois, 1997.
105. Hussein H. A., El-Khabaz K. A. S., Malek S. S.: Is udder ultrasonography a diagnostic tool for subclinical mastitis in sheep? *Small Ruminant Research*. 139: 121-8. 2015.
106. Hutchens T. W., Henry J. F., Yip T. T., Hachey D. L., Schanler R. J., Motil K. J., Garza C.: Origin of intact lactoferrin and its DNA-binding fragments found in the urine of human milk-fed preterm infants. Evaluation by stable isotopic enrichment. *Pediatric Research*. 29(3): 243-50. 1991.
107. Ikeda M., Nozaki A., Sugiyama K., Tanaka T., Naganuma A., Tanaka K., Sekihara H., Shimotohno K., Saito M., Koto N.: Characterization of antiviral activity of lactoferrin against hepatitis C virus infection in human cultured cells. *Virus Researcher*. 66(1): 51-63. 2000.

108. Indriss SH. E, Foltys V., Tančin V., Kirchnerová K., Zaujec K.: Mastitis pathogens in milk of dairy cows in Slovakia. *Slovak Journal of Animal Science*. 46(3): 115-9. 2013.
109. Jackson P. G. G., Cockcroft P. D.: Clinical examination of the udder. Clinical examination farm animals. Blackwell Science Ltd. 154-166. 2002.
110. Jameson G. B., Anderson G. E., Norris G. E., Thomas D. H., Baker E. N.: Structure of human apolactoferrin at 2.0 Å resolution. Refinement and analysis of ligand-induced conformational change. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 55: 1108. 1998.
111. Jánosi Sz., Huszenicza G.: The use of the dry cow therapy in the control of bovine mastitis. *Veterinary Medicine - Czech (Veterinárni medicína)*. 46(2): 55-60. 2001.
112. Javadi T., Acorda A.: Ultrasound features and echo mean values of udder and teat in dairy cows with mastitis. *Philippine Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 37(2): 167-76. 2011.
113. Jenssen H., Hancock R. E. W.: Antimicrobial properties of lactoferrin. *Biochimie*. 91(1): 19-29. 2009.
114. Johansson B. G.: Chromatographic separation of lactalbumin from human milk whey on calcium phosphate columns. *Nature*. 181(4614): 996-7. 1958.
115. Kai K., Komine Y., Komine K., Asai K., Kuroishi T., Kozutsumi T., Itagaki M., Ohta M., Kumagai K.: Effect of bovine lactoferrin by the intramammary infusion in cows with staphylococcal mastitis during the early non-lactating period. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 64(10): 873-8. 2002.
116. Katić V.: Mastitis: stanje i perspektive. Zbornik radova 23. Savetovanje veterinara Srbije. 13-16. Septembar 2012. Zlatibor. 91-105. 2012.
117. Kawai K., Hagiwara S., Anri A., Nagahata H.: Lactoferrin concentration in milk of bovine clinical mastitis. *Veterinary Research Communications*. 23(7): 391-8. 1999.
118. Kawai K., Nagahata H., Lee N.-Y., Anri A., Shimazaki K.: Effect of infusing lactoferrin hydrolysate into bovine mammary glands with subclinical mastitis. *Veterinary Research Communications*. 27(7): 539-48. 2003.
119. Khoramian B., Vajhi A., Ghasemzadeh-Nava H., Ahrari-Khafi M. S., Bahonar A.: Ultrasonography of the supramammary lymph nodes for diagnosis of bovine chronic subclinical mastitis. *Iran Journal of Veterinary Research*. 16(1): 75-7. 2015.
120. Kijlstra A., Jeurissen S. H., Koning K. M.: Lactoferrin levels in normal human tears. *British Journal of Ophthalmology*. 67(3): 199-202. 1983.
121. Kirkpatrick C. H., Green I., Rich R. R., Schade A. L.: Inhibition of growth of *Candida albicans* by iron-unsaturated lactoferrin: relation to host-defense mechanisms in chronic mucocutaneous candidiasis. *The Journal of Infectious Diseases*. 124(6): 539-44. 1971.
122. Kitchen B.: Review of the progress of dairy science: Bovine mastitis: Milk compositional changes and related diagnostic tests. *Journal of Dairy Research*. 48(1): 167-88. 1981.
123. Klaas I. C., Enevoldsen C., Vaarst M., Houe H.: Systematic clinical examinations for identification of latent udder health types in Danish dairy herds. *Journal of Dairy Science*. 87(5): 1217-28. 2004.



124. Klein D., Flock M., Khol J. L., Franz S., Stuger H. P., Baumgartner W.: Ultrasonographic measurements of the bovine teat: breed differences and the significance of the measurements for udder health. *Journal of Dairy Research*. 72: 296-302. 2005.
125. Komine K., Komine Y., Kuroishi T., Kobayashi J., Obara Y., Kumagai K.: Small molecule lactoferrin with an inflammatory effect but no apparent antibacterial activity in mastitic mammary gland secretion. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 67(7): 667-77. 2005.
126. Komine Y., Komine K., Kai K., Itagaki M., Kuroishi T., Aso H., Obara Y., Kumagai K.: Effect of combination therapy with lactoferrin and antibiotics against staphylococcal mastitis on drying cows. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 68(3): 205-11. 2006.
127. Korhonen H., Marnila P., Gill H. S.: Milk immunoglobulins and complement factors. *British Journal of Nutrition*. 84(1): 75-80. 2000.
128. Kotb E. E. Z., Abu-Seida A. M., Fadel M. S.: The correlation between ultrasonographic and laboratory findings of mastitis in buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Global Veterinaria*. 13(1): 68-74. 2014.
129. Król J., Litwińczuk Z., Brodziak A., Barłowska J.: Lactoferrin, lysozyme and immunoglobulin G content in milk of four breeds of cows managed under intensive production system. *Polish Journal of Veterinary Science*. 13(2): 357-61. 2010.
130. Król J., Brodziak A., Litwińczuk Z., Barłowska J.: (2012). Selected factors determining the content of lactoferrin, lysozyme and immunoglobulins G in bovine milk. A search for antibacterial agents. Dr. Varaprasad Bobbarala (Ed.). 2012. ISBN: 978-953-51-0724-8, InTech, DOI: 10.5772/46047. Available from: <http://www.intechopen.com/books/a-search-for-antibacterial-agents/selected-factors-determining-the-content-of-lactoferrin-lysozyme-and-immunoglobulins-g-in-bovine-mil>
131. Kussendrager K.: Lactoferrin and lactoperoxidase. Bioactive milk proteins. *International Food Ingredients*. 6: 17-21. 1993.
132. Kutila T., Pyörälä S., Kaartinen L., Vahtola K., Myllykoski L., Saloniemi H.: Disposition kinetics of lactoferrin in milk after intramammary administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 25(2): 129-33. 2002.
133. Kutila P., Pyörälä S., Kaartinen L., Isomäki R., Vahtola K., Myllykoski L., Saloniemi H.: Lactoferrin and citrate concentration at drying-off and during early mammary involution of dairy cows. *Journal of veterinary medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine*. 50(7): 350-3. 2003a.
134. Kutila T., Pyörälä S., Saloniemi H., Kaartinen L.: Antibacterial effect of bovine lactoferrin against udder pathogens. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 44(1-2): 35-42. 2003b.
135. Kutila T.: Role of lactoferrin in treatment of bovine mastitis. Academic dissertation. Helsinki. Finland. 2004.
136. Kutila T., Suojala L., Lehtolainen T., Saloniemi H., Kaartinen L., Tähti M., Seppälä K., Pyörälä S.: The efficacy of bovine lactoferrin in the treatment of cows with experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 27(4): 197-202. 2004.

137. Lacasse P., Lauzon K., Diarra M. S., Petitclerc D.: Utilization of lactoferrin to fight antibiotic-resistant mammary gland pathogens. *Journal of Animal Science*. 86(Suppl.1): 66-71. 2008.
138. Laevens H., Deluyker H., Schukken Y. H., De Meulemeester L., Vandermeersch R., De Mue Lenaere E., De Kruif A.: Influence of parity and stage of lactation on the somatic cell count in bacteriologically negative dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 80(12): 3219-26. 1997.
139. Lakew M., Tolosa T., Tigre W.: Prevalence and major bacterial causes of bovine mastitis in Asella, South Eastern Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*. 41(7): 1525-30. 2009.
140. Langer A., Sharma S., Sharma N. K., Nauriyal D. S.: Comparative efficacy of different mastitis markers for diagnosis of subclinical mastitis in cows. *International Journal of Applied Science and Biotechnology*. 2(2): 121-5. 2014.
141. Larson B. L.: Biosynthesis and secretion of milk proteins: a review. *Journal of Dairy Research*. 46(2): 161-74. 1979.
142. Larson B. L.: Lactation. Ames: Iowa State University Press. 1995.
143. Lash J. A., Coates T. D., Lafuze J., Baehner R. L., Boxer L. A.: Plasma lactoferrin reflects granulocyte activation in vivo. *Blood*. 61(5): 885-8. 1983.
144. Leboffe L., Giansanti F., Antonini G.: Antifungal and antiparasitic activities of lactoferrin. *Anti-Infective Agents in Medical Chemistry*. 8(2): 114-27. 2009.
145. LeGard H. M.: Clinical examination of the bovine udder. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. 2(4): 111-2. 1938.
146. León-Sicairos N., López-Sato F., Reyes-López M., Godínez-Vargas D., Ordaz-Pichardo C., de la Garza M.: Amoebicidal activity of milk, apo-lactoferrin, sIgA and lysozyme. *Clinical Medicine & Research*. 4(2): 106-13. 2006.
147. Levay P. F., Viljoen M.: Lactoferrin: A general review. *Haematologica*. 80(3): 252-67. 1995.
148. Lin J., Hogan J. S., Smith K. L.: Growth responses of coliform bacteria to purified immunoglobulin G from cows immunized with ferric enterobactin receptor FepA. *Journal of Dairy Science*. 82(1): 86-92. 1999.
149. Lindmark-Mansson H., Svensson U., Paulsson M., Alden G., Frank B., Johnsson G.: Influence of milk components, somatic cell and supplemental zinc on milk processability. *International Dairy Journal*. 10(7): 423-33. 2000.
150. Liu G. L., Wang J. Q., Bu D. P., Cheng J. B., Zhang C. G., Wei H. Y., Zhou L. Y., Zhou Z. F., Hu H., Dong X. L.: Factors affecting the transfer of immunoglobulin G1 into the milk of Holstein cows. *The Veterinary Journal*. 182(1): 79-85. 2009.
151. Loo V. G., Lalonde R. G.: Role of iron in intracellular growth of *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*. 45(3): 726-30. 1984.
152. Maćešić N., Karadjole T., Bačić G., Benić M., Karadjole M., Vince S., Lipar M., Cergolj M.: Aetiology and prevalence of bovine intramammary infection at drying off. *Veterinarski Arhiv*. 82(2): 125-31. 2012.
153. Makek Z.: Osvrt na dijagnostiku, terapiju i preventivne upala mliječne žlijezde u krava. *Mljekarstvo*. 45(4): 275-82. 1995.
154. Malmquist J., Hansen N. E., Karle H.: Lactoferrin in haematology. *Scandinavian Journal of Haematology*. 21(1):5-8. 1978.

155. Mansell P.D., Seguya A.: The use of a hand-held conductivity meter for the diagnosis of subclinical mastitis in dairy cows during late lactation. *New Zealand Veterinary Journal*. 51(1): 21-5. 2003.
156. Marchetti M., Superti F., Ammendolia M. G., Rossi P., Valenti P., Seganti L.: Inhibition of poliovirus type 1 infection by iron-, manganese-, and zinc-saturated lactoferrin. *Medical Microbiology and Immunology*. 187(4): 199-204. 1999.
157. Markey B., Leonard F., Archambault M., Cullinane A., Maguire D.: *Clinical Veterinary Microbiology*. Second edition. Mosby, Elsevier. 2013.
158. Masschalck B., Michiels C. W.: Antimicrobial properties of Lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*. 29(3): 191-214. 2003.
159. Masson P. L., Heremans J. F., Dive C.: An iron-binding protein common to many external secretions. *Clinica Chimica Acta*. 14(6): 735-9. 1966.
160. Masson P. L., Heremans J. F., Schonke E.: Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes. *The Journal of Experimental Medicine*. 130(3): 643-58. 1969.
161. Masson P. L., Heremans J. F.: Lactoferrin in milk from different species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 39(1): 119-29. 1971.
162. McDonald J. S.: Radiographic method for anatomic study of the teat canal; changes between milking periods. *American Journal of Veterinary Research*. 36: 1241-2. 1975.
163. McDonald J. S.: Radiographic method for anatomical study of the teat canal; changes within the first lactation. *American Journal of Veterinary Research*. 34: 169-71. 1973.
164. Metz-Boutigue M. H., Jolles J., Mazurier J., Schoentgen F., Legrand D., Spik G., Montreuil J., Jolles P.: Human lactotransferrin: Amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *European Journal of Biochemistry*. 145: 659-76. 1984.
165. Moguilevsky N., Masson P. L., Courtoy P. J.: Lactoferrin uptake and iron processing into macrophages: A study in familial haemochromatosis. *British Journal of Haematology*. 66(1): 129-36. 1987.
166. Musser J. M. B., Anderson K. L., Caballero M., Amaya D., Maroto-Puga J.: Evaluation of a hand-held electrical conductivity meter for detection of subclinical mastitis in cattle. *American Journal of Veterinary Research*. 59(9): 1087-91. 1998.
167. Naidu S. S., Svenson U., Kishore A. R., Naidu A. S.: Relationship between antibacterial activity and porin binding of lactoferrin in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 37(2): 240-5. 1993.
168. Natzke R. P.: Elements of mastitis control. *Journal of Dairy Science*. 64(6): 1431-42. 1981.
169. Neijenhuis F., Barkema H. W., Hogeveen H., Noordhuizen J. P. T. M.: Classification and longitudinal examination of callused teat ends in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 83(12): 2795- 804. 2000.
170. Neijenhuis F.: Teat condition in dairy cows. Dissertation Utrecht University. ISBN 90-6464-825-5. 2004.

171. Neilands J. B.: Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *The Journal of Biological Chemistry*. 270(45): 26723-6. 1995.
172. Neville M. C., McFadden T., Forsyth I.: Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 7: 49-66. 2002.
173. Newman K. A., Rajala-Schultz P. J., Lakritz J., DeGraves F. J.: Lactoferrin concentration in bovine milk prior to dry-off. *Journal of Dairy Research*. 76(4): 426-32. 2009.
174. Nickerson S. C., Baker P. A., Trinidad P.: Local immunostimulation of the bovine mammary gland with interleukin-2. *Journal of Dairy Science*. 72(7): 1764-73. 1989.
175. Nickerson S. C.: Immunological aspects of mammary involution. *Journal of Dairy Science*. 72(6): 1665-78. 1989.
176. Nickerson S. C., Akers R. M.: Mammary gland/Anatomy. Encyclopedia of dairy science. Elsevier Science Ltd. 1680-89. 2002.
177. Nielen M., Deluyker H., Schukken Y., Brand A.: Electrical conductivity of milk: measurement, modifiers, and meta-analysis of mastitis detection performance. *Journal of Dairy Science*. 75(2): 606-14. 1992.
178. Nielen M., Schukken Y., Brand A.: Detection of subclinical mastitis from on-line milking parlor data. *Journal of Dairy Science*. 78(5), 1039-49. 1995.
179. Nielsen C.: Economic impact of mastitis in dairy cows. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Science. Uppsala. 2009.
180. Nishimura M., Yoshida T., El-Khodery S., Miyoshi M., Furuoka H., Yasuda J., Miyahara K.: Ultrasound imaging of mammary gland in dairy heifers at different stage of growth. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 73(1): 19-24. 2011.
181. Nonnecke B. J., Smith K. L.: Biochemical and antibacterial properties of bovine mammary involution and at parturition. *Journal of Dairy Science*. 67(12): 2863-72. 1984.
182. Norberg E., Hogeveen H., Korsgaard I. R., Friggens N. C., Sloth K. H. M. N., Løvendahl P.: Electrical conductivity of milk: Ability to predict mastitis status. *Journal of Dairy Science*. 87(4): 1099-107. 2004.
183. Nuijens J. H., Abbink J. J., Wachtfogel Y. T., Colman R. W., Eerenberg A. J., Dors D., Kamp A. J., Strack van Schijndel R. J., Thijs L. G., Hack C. E.: Plasma elastase alpha 1-antitrypsin and lactoferrin in sepsis: evidence for neutrophils as mediators in fatal sepsis. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 119(2): 159-68. 1992.
184. Olde Riekerink R. G. M., Barkema H. W., Kelton D. F., Scholl D. T.: Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. *Journal of Dairy Science*. 91(4): 1366-77. 2008.
185. Oliver S. P., Bushe T.: Growth inhibition of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* during involution of the bovine mammary gland: relation to secretion composition. *American Journal of Veterinary Research*. 48(12): 1669-73. 1987.
186. Oram J. D., Reiter B.: Inhibition of bacteria by lactoferrin and other iron-chelating agents. *Biochimica et Biophysica Acta*. 170(2): 351-65. 1968.
187. Paduch J. H., Mohr E., Krömker V.: The association between teat end hyperkeratosis and teat canal microbial load in lactating dairy cattle. *Veterinary Microbiology*. 158(3-4): 353-9. 2012.

188. Pantić V.: Histologija, Medicinska knjiga, Beograd, 1995.
189. Park H. M., Almeida R. A., Oliver S. P.: Identification of lactoferrin-binding protein in *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* and *Streptococcus agalactiae* isolated from cows with mastitis. *FEMS Microbiology Letters*. 207(1): 87-90. 2002.
190. Patel D., Almeida R. A., Dunlap J. R., Oliver S. P.: Bovine lactoferrin serves as a molecular bridge for internalization of *Streptococcus uberis* into bovine mammary epithelial cell. *Veterinary Microbiology*. 137(3-4): 297-301. 2009.
191. Persson K., Larsson I., Hallen Sandgren C.: Effects of certain inflammatory mediators on bovine neutrophil migration in vivo and in vitro. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 37(2): 99-112. 1993.
192. Persson Waller K., Persson Y., Nyman A. K., Stengärde L.: Udder health in beef cows and its association with calf growth. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 56:9. 2014. doi: 10.1186/1751-0147-56-9.
193. Petitclerc D., Lauzon K., Cochu A., Ster C., Diarra M. S., Lacasse P.: Efficacy of a lactoferrin-penicillin combination to treat  $\beta$ -lactam-resistant *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science*. 90(6): 2778-87. 2007.
194. Petzer I. M., Lourens D. C., van der Schans T. J., Watermeyer J. C., van Reenen R., Rautenbach G. H., Thompson P.: Intramammary infection rate during the dry period in cows that received blanket dry cow therapy: efficacy of 6 different dry-cow intra-mammary antimicrobial products. *Journal of the South African Veterinary Association*. 80(1): 23-30. 2009.
195. Pierce A., Colavizza D., Bennaissa M., Maes P., Tartar A., Montreuil J., Spike G.: Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactotransferrin. *European Journal of Biochemistry*. 196(1): 177-84. 1991.
196. Pravilnik o kvalitetu sirovog mleka. Sl. glasnik RS br. 21/2009.
197. Pyörälä S.: Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Veterinary Research*. 34(5): 565-78. 2003.
198. Pyörälä S., Taponen S.: Coagulase-negative staphylococci- Emerging mastitis pathogens. *Veterinary Microbiology*. 134(1-2): 3-8. 2009.
199. Radinović M.: Ispitivanje uticaja patogena prvog i drugog reda na broj somatskih ćelija i kvalitet mleka u krava. Magistarska teza. Novi Sad. 2008.
200. Rainard P., Poutrel B., Caffin J. P.: Lactoferrin and transferrin in bovine milk in relation to certain physiological and pathological factors. *Annales de recherches vétérinaires*. 13(4): 321-8. 1982.
201. Rainard P., Caffin J. P.: Sequential changes in serum albumin, immunoglobulin (IgG1, IgG2, IgM) and lactoferrin concentrations in milk following infusion of *Escherichia coli* into the udder of immunized and unimmunized cows. *Annals of Veterinary Research*. 14(3): 271-9. 1983.
202. Rainard P.: Bacteriostatic activity of bovine milk lactoferrin against mastitic bacteria. *Veterinary Microbiology*. 11(4): 387-92. 1986.
203. Rainard P., Riollot C.: Innate immunity of the bovine mammary gland. *Veterinary Research*. 37(3): 369-400. 2006. DOI: 10.1051/vetres:2006007
205. Reddy B. S. S., Kumari K. N., Reddy Y. R., Reddy M. V. B., Reddy B. S.: Comparison of different diagnostic tests in subclinical mastitis in dairy cattle. *International Journal of Veterinary Science*. 3(4): 224-8. 2014.

206. Reyher K. K., Haine D., Dohoo I. R., Revie C. W.: Examining the effect of intramammary infections with minor mastitis pathogens on the acquisition of new intramammary infections with major mastitis pathogens- A systematic review and meta- analysis. *Journal of Dairy Science*. 95(11): 6483-502. 2012.
207. Roşeanu A., Damian M., Evans R. W.: Mechanisms of the antibacterial activity of lactoferrin and lactoferrin-derived peptides. *Romanian Journal of Biochemistry*. 47(2): 203-9. 2010.
208. Ruegg P. L., Reinemann D. J.: Milk quality and mastitis tests. *Bov. Pract.* 36, 41-54. 2002.
209. Sánchez L., Aranda P., Perez M. D., Calvo M.: Concentration of lactoferrin and transferrin throughout lactation in cows' colostrums and milk . *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*. 369(9): 1005-8. 1988.
210. Schafer K. H.: Electrophoretic studies on milk protein problem. *Monatsschrift Kinderheilkunde*. 99: 69-71. 1951.
211. Schalm O. W., Noorlander D. O.: Experiments and observations leading to development of the California mastitis test. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 130(5): 199-204. 1957.
212. Schanbacher F. L., Goodman R. E., Talhouk R. S.: Bovine mammary lactoferrin: implications from messenger ribonucleic acid (mRNA) sequence and regulation contrary to other milk proteins. *Journal of Dairy Science*. 76(12): 3812-31. 1993.
213. Seguya A. G., Mansell P. D.: An evaluation of a hand-held electrical resistance meter for diagnosis of bovine subclinical mastitis in late lactation under Australian conditions. *Australian Veterinary Journal*. 78(9): 608-11. 2000.
214. Sejrnsen K., Huber J. T., Tucker H. A., Akers R. M.: Influence of nutrition of mammary development in pre - and postpubertal heifers. *Journal of Dairy Science*. 65(5): 793-800. 1982.
215. Sejrnsen K.: Relationship between nutrition, puberty and mammary development in cattle. *Proceedings of the Nutrition Society*. 53(1):103-11. 1994.
216. Seker I., Risvanli A., Yuksel M., Saat N., Ozmen O.: Relationship between California mastitis test score and ultrasonographic teat measurements in dairy cows. *Australian Veterinary Journal*. 87(12): 480-3. 2009.
217. Sharif A., Muhammad G.: Somatic cell count as an indicator of udder health status under modern dairy production. A review. *Pakistan Veterinary Journal*. 28(4): 194-200. 2008.
218. Sharma N., Pandey V., Sudan N. A.: Comparison of some indirect screening tests for detection of subclinical mastitis in dairy cows. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. 13(2): 98-103. 2010.
219. Shearer J. K., Townsend J. R., Gibbs E. P. J.: Skin infections of the bovine teat and udder and their differential diagnosis. *Bovine medicine- Diseases and husbandry of cattle*. Blackwell Science. 363-72. 2004.
220. Shimazaki K.: Lactoferrin: A marvelous protein in milk? *Animal Science Journal*. 71(4): 329-47. 2000.
221. Sinha Y. N., Tucker H. A.: Mammary development and pituitary prolactin level of heifers from birth through puberty and during the estrous cycle. *Journal of Dairy Science*. 52: 507-12. 1969.

222. Sinha M., Kaushik S., Kaur P., Sharma S., Singh T. P.: Antimicrobial lactoferrin peptides: The hidden players in the protective function of a multifunctional protein. *International Journal of Peptides*. 2013(12):390230.
223. Sol J., Sampimon O. C., Snoep J. J., Schukken Y. H.: Factors associated with bacteriological cure during lactation after therapy for subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Dairy Science*. 80(11): 2803-8. 1997
224. Sordillo L. M., Nickerson S. C., Akers R. M., Oliver S. P.: Secretion composition during bovine mammary involution and the relationship with mastitis. *International Journal of Biochemistry*. 19(12): 1165-72. 1987.
225. Sordillo L. M., Nickerson S. C.: Morphometric changes in the bovine mammary gland during involution and lactogenesis. *American Journal of Veterinary Research*. 49(7): 1112-20. 1988.
226. Sordillo L. M., Shafer-Weaver K., DeRosa D.: Immunobiology of the mammary gland. *Journal of Dairy Science*. 80(8): 1851-65. 1997.
227. Sorensen M., Sorensen S. P. L.: The proteins in whey. *Comptes-rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg*. 23(7): 55-99. 1939.
228. Steijns J. M., van Hooijdonk A. C.: Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. *British Journal of Nutrition*. 84: S11-7. 2000.
229. Stelwagen K., Carpenter E., Haigh B., Hodgkinson A., Wheeler T. T.: Immune components of bovine colostrums and milk. *Journal of Animal Science*. 87(13): 3-9. 2009.
230. Steverding D., Stierhof Y. D., Fuchs H., Tauber R., Overath P.: Transferrin-binding protein complex is the receptor for transferring uptake in *Trypanosoma brucei*. *The Journal of Cell Biology*. 131(5): 1173-82. 1995.
231. Stojanović L., Petrović M., Katić V.: Značaj mastitisa u proizvodnji mleka. Simpozijum mastitis i kvalitet mleka. Srpsko veterinarsko društvo. Zbornik radova. Vrnjačka Banja 30. maj-2. jun 2001. pp: 1-8. 2001.
232. Stumpf P., Welch U.: Secretory and defensive functions of the duct system of the lactating mammary gland of the African elephant (*Loxodonta africana*, *proboscidea*). *Zoomorphology*. 123(3): 155-67. 2004.
233. Suriyasathaporn W., Schukken Y. H., Nielen M., Brand A.: Low somatic cell count: a risk factor for subsequent clinical mastitis in a dairy herd. *Journal of Dairy Science*. 83(6): 1248-55. 2000.
234. Swinkels J. M., Hogeveen H., Zadoks R. N.: A partial budget model to estimate economic benefits of lactational treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science*. 88(12): 4273-87. 2005.
235. Szencziová I., Strapák P.: Ultrasonography of the udder and teat in cattle: perspective measuring technique. *Slovak Journal of Animal Science*. 45(3): 96-104. 2012.
236. Takayanagi N., Niida Y., Chiba C.: As chemical mediator on inflammation and immunity. *Shounika-Rinshou*. 39: 1287-93. 1986.
237. Tanaka T., Omata Y., Saito A., Shimazaki K., Igarashi I., Suzuki N.: Growth inhibitory effects of bovine lactoferrin to *Toxoplasma gondii* parasites in murine somatic cells. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 58(1): 61-5. 1996.
238. Tančin V.: Somatic cell count in milk of dairy cows under practical conditions. *Slovak Journal of Animal Science*. 46(1): 31-4. 2013.

239. Tolosa T., Verbeke J., Ayana Z., Piepers S., Supré K., De Vlieghe S.: Pathogen group specific risk factors for clinical mastitis, intramammary infection and blind quarters at the herd, cow and quarter level in smallholder dairy farms in Jimma, Ethiopia. *Preventive Veterinary Medicine*. 120(3-4): 306-12. 2015.
240. Tomita M., Bellamy W., Takase M., Yamauchi K., Wakabayashi H., Kawase K.: Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *Journal of Dairy Science*. 74(12): 4137-42. 1991.
241. Torres J. M., Concepción J. L., Vielma J. R.: Detección de lisozima y lactoferrin por western blot en ovas de Trucha arcoiris (*oncorhynchus mykiss*). *Mundo Pecuário*. 2(3):57-9. 2006.
242. Trostle S., O'Brien R.: Ultrasonography of the bovine mammary gland. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*. 20(2 part 1): 64-71. 1998.
243. Tsuji S., Hirata Y., Mukai F., Ohtagaki S.: Comparison of lactoferrin content in colostrums between different cattle breeds. *Journal of Dairy Science*. 73(1): 125-8. 1990.
244. Tucker H. A.: Factors affecting mammary gland cell numbers. *Journal of Dairy Science*. 52: 720-9. 1969.
245. Turchany J. M., Aley S. B., Gillin F. D.: Giardicidal activity of lactoferrin and N-terminal peptides. *Infection and Immunity*. 63(11): 4550-2. 1995.
246. Turner S. A., Williamson J. H., Roche J. R., Kolver E. S.: Diet and genotype affect milk lactoferrin concentrations in late lactation. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*. 63: 87-90. 2003.
247. Tyler H. D., Ensminger M. E.: Dairy cattle science. Pearson Prentice Hall. 2006.
248. van der Kraan M. I., Groenink J., Nazmi K., Veerman E. C., Bolscher J. G., Nieuw Amerongen A. V.: Lactoferrampin: A novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine lactoferrin. *Peptides*. 25(2): 177-83. 2004.
249. van der Strate B. W. A., Beljaars L., Molema G., Harmsen M. C., Meijer D. K. F.: Antiviral activities of lactoferrin. *Antiviral Research*. 52(3): 225-39. 2001.
250. van Veen H. A., Geerts M. E. J., van Berkel P. H. C., Nuijens J. H.: The role of N-linked glycosylation in the protection of human and bovine lactoferrin against tryptic proteolysis. *European Journal of Biochemistry*. 271(4): 678-84. 2004.
251. Varatanović N., Podžo M., Mutevelić T., Podžo K., Čengić B., Hodžić A., Hodžić E.: Use of Californija mastitis test, somatic cells count and bacteriological findings in diagnostics of subclinical mastitis. *Biotechnology of Animal Husbandry*. 26(1-2): 65-74. 2010.
252. Wang W. P., Iigo M., Sato J., Sekine K., Adachi I., Tsuda H.: Activation of mucosal intestinal immunity in tumor-bearing mice by lactoferrin. *Japanese Journal of Cancer Research*. 91(10): 1022-7. 2000.
253. Ward P. P., Paz E., Connely O. M.: Multifunctional roles of lactoferrin: A critical overview. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 62(22): 2540-8. 2005.
254. Welty F. K., Smith K. L., Schanbacher F. L.: Lactoferrin concentration during involution of the bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science*. 59(2): 224-31. 1976.
255. Wielgosz-Groth Z., Sobczuk-Szul M., Wronski M., Rzemieniewski A.: Season and production level on composition of proteins in milk of Polish Holstein-Friesian. *Biul. Nauk*. 30: 135-9. 2009.



256. Williamson J. H., Woolford M. W., Day A. M.: The prophylactic effect of a dry-cow antibiotic against *Streptococcus uberis*. *New Zealand Veterinary Journal* 43(6): 228-34. 1995.
257. Wilson D. J., Gonzalez R. N., Das H. H.: Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: prevalence and effect on somatic cell count and milk production. *Journal of Dairy Science*. 80(10): 2582-8. 1997.
258. Witzig, P., Hugelshofer J.: Clarification of teat stenoses using radiography double contrast staining. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*. 126, 155-63. 1984.
259. Wong H., Schryvers A. B.: Bacterial lactoferrin-binding protein A binds to both domains of the human lactoferrin C-lobe. *Microbiology*. 149(Pt 7): 1729-37. 2003.
260. 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. *Journal of Dairy Research*. 65(2): 187-98. 1998.
261. Ziere G. J., van Dijk M. C. M., Bijsterbosh M. K., van Berkel T. J. C.: Lactoferrin uptake by the rat liver. Characterization of the recognition site and effect of selective modification of arginine residues. *The Journal of Biological Chemistry*. 267(16): 11229-35. 1992.

## **PRILOZI**

**Prilog 1.** Lista za unos podataka dobijenih kliničkim i ultrazvučnim pregledom vimena  
krava

<b>KLINIČKI PREGLED VIMENA KRAVA</b>	
<b>1. OPŠTI PODACI</b>	
Broj životinje	_____
Rasa	_____
Starost	_____
Period laktacije	_____
<b>2. ZDRAVSTVENO STANJE</b>	
Opšte stanje	_____
Trajanje bolesti	<input type="checkbox"/> manje od nedelju dana <input type="checkbox"/> više od nedelju dana
Zahvaćena četvrt	<input type="checkbox"/> PL <input type="checkbox"/> PD <input type="checkbox"/> ZL <input type="checkbox"/> ZD
Adspekcija vimena	<input type="checkbox"/> crvenilo <input type="checkbox"/> deformacija vimena <input type="checkbox"/> temperiranost <input type="checkbox"/> edem <input type="checkbox"/> deformacija sisa
NAPOMENA	_____ _____
Palpacija vimena	_____ _____
Bolnost vimena	<input type="checkbox"/> DA <input type="checkbox"/> NE
CMT	PL _____ PD _____ ZL _____ ZD _____
Draminski	PL _____ PD _____ ZL _____ ZD _____
Konzistencija mleka	_____ _____
<b>BROJEVI ULTRAZVUČNIH SLIKA</b>	
<b>1. PARENHIM</b>	
PL	_____
PD	_____
ZL	_____
ZD	_____
<b>2. SISNI KANAL</b>	
PL	_____
PD	_____
ZL	_____
ZD	_____

**Prilog 2.** Diferencijalne karakteristike stafilokoka (Markey i sar., 2013)

<b>Karakteristike</b>	<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	<b><i>Staphylococcus epidermidis</i></b>	<b><i>Staphylococcus simulans</i></b>
Koagulaza	+	-	-
DNA-aza	+	11 od 89% sojeva su pozitivna	-
Hemoliza	+	11 od 89% sojeva su pozitivna	11 od 89% sojeva su pozitivna
Alkalna fosfataza	+	11 od 89% sojeva su pozitivna	11 od 89% sojeva su pozitivna
Ureaza	11 od 89% sojeva su pozitivna	+	+
Fermentacija manitola	+	-	+
Osetljivost na novobiocin	S	S	S
Osetljivost na <i>polymyxin B</i>	R	R	S
Trehaloza	+	-	11 od 89% sojeva su pozitivna
Ksiloza	-	-	-

**Prilog 3.** Diferencijalne karakteristike streptokoka (Markey i sar., 2013)

<b>Karakteristike</b>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	<i>Streptococcus uberis</i>
Serološka grupa	B	C	E
Hemoliza	$\alpha$ , $\beta$ ili $\gamma$	$\alpha$ , $\gamma$	$\alpha$ , $\gamma$
CAMP test	+	-	-
Eskulin	-	-	+
Manitol	-	-	+
Salicin	-	-	+
Saharoza	+	+	+
Laktoza	+	+	+
Sorbitol	-	-	+

**Prilog 4.** Osetljivost izolovanih mikroorganizama na antimikrobne lekove na osnovu disk- difuzione metode

Antimikrobni lek	Bakteriološki nalaz					
	<i>Staph. aureus</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>E. faecium</i>	<i>A. pyogenes</i>	CNS
Ampicilin 10 µg	S	S	S	S	S	S
Amoxicillin 25 µg	S	S	S	S	S	S
Amoxicillin/clavulanic acid 20/10 µg	S	S	S	S	S	S
Penicilin 10U	S	S	S	R	S	S
Neomycin 30 µg	S	R	R	R	S	S
Tetracycline 30 µg	S	R	R	R	I	S
Trimethoprim 5 µg	S	R	R	R	R	S
Novobiocin 5 µg	S	R	R	R	R	R
Bacitracin 0.04U	12 mm	R	R	R	S	R

R- rezistentan; I- intermedijarno osetljiv; S- senzitiv

**Prilog 5.** Tablica određivanja imunoglobulina G na osnovu prečnika precipitipinskog prstena (INEP, Zemun)

<b>R</b>	<b>g/L</b>	<b>R</b>	<b>g/L</b>	<b>R</b>	<b>g/L</b>
4.0	0.088	6.0	0.618	8.0	1.359
4.1	0.110	6.1	0.650	8.1	1.402
4.2	0.132	6.2	0.682	8.2	1.445
4.3	0.154	6.3	0.715	8.3	1.488
4.4	0.177	6.4	0.749	8.4	1.533
4.5	0.201	6.5	0.783	8.5	1.577
4.6	0.225	6.6	0.818	8.6	1.623
4.7	0.249	6.7	0.853	8.7	1.668
4.8	0.275	6.8	0.889	8.8	1.715
4.9	0.300	6.9	0.925	8.9	1.762
5.0	0.326	7.0	0.962	9.0	1.809
5.1	0.353	7.1	0.999	9.1	1.857
5.2	0.380	7.2	1.037	9.2	1.906
5.3	0.408	7.3	1.076	9.3	1.954
5.4	0.437	7.4	1.114	9.4	2.009
5.5	0.465	7.5	1.154	9.5	2.054
5.6	0.495	7.6	1.194	9.6	2.105
5.7	0.525	7.7	1.234	9.7	2.156
5.7	0.555	7.8	1.275	9.8	2.207
5.9	0.586	7.9	1.317	9.9	2.260

## BIOGRAFSKI PODACI

Annamaria Galfi rođena je 22. maja 1983. godine u Subotici. Osnovnu školu „Miroslav Antić“ završila je na Paliću, dok srednjoškolsko obrazovanje stiče u Novom Sadu, u Medicinskoj školi „7. april“.

Integrisane akademske studije veterinarske medicine završila je na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu prosečnom ocenom 9, pri čemu je uspešno odbranila diplomski-master rad pod naslovom „Etiologija poremećaja varenja u predželucima goveda“.

Doktorske studije na Poljoprivrednom fakultetu, smer veterinarska medicina, upisuje školske 2009/10. godine. Iste godine, kao stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja uključuje se na republički projekat „Razvoj imunoloških metoda za dijagnostiku retkih parazitskih zoonoza“ TR 23032. Na projekatu „Odabrane biološke opasnosti za bezbednost/kvalitet hrane animalnog porekla i kontrolne mere od farme do potrošača“ TR 31034, prvo je učestvovala kao stipendista Ministarstva, a potom, od 2013. godine, kao istraživač saradnik.

Do sada je autor i koautor više od trideset naučnih radova i saopštenja iz oblasti veterinarske medicine. Svoje radove je izlagala na međunarodnim i nacionalnim skupovima.

Od školske 2009/2010. godine do danas aktivno učestvuje u izvođenju vežbi na predmetu Rendgenologija i fizikalna terapija, na smeru veterinarska medicina.

Pored srpskog jezika, govori mađarski i engleski jezik.