

**Univerzitet u Beogradu  
Fakultet veterinarske medicine**

**Mr Božidar M. Đukić**

**Molekularno-genetska karakterizacija  
*Prototheca zopfii* kao uzročnika mastitisa  
krava u Srbiji**

**Doktorska disertacija**

**Beograd, 2016.**

**University of Belgrade  
Faculty of Veterinary Medicine**

**Mr Božidar M. Đukić**

**Molecular genetic characterization of  
*Prototheca zopfii* as causative agent of  
mastitis in cows in Serbia**

**Doctoral thesis**

**Belgrade, 2016.**

## **MENTOR:**

**Dr SLOBODANKA VAKANJAC, vanredni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Beograd**

**Dr JEVROSIMA STEVANOVIĆ, vanredni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Beograd**

## **ČLANOVI KOMISIJE:**

- 1. Dr SLOBODANKA VAKANJAC, vanredni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Beograd**
- 2. Dr JEVROSIMA STEVANOVIĆ, vanredni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Beograd**
- 3. Dr VERA KATIĆ, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Beograd**
- 4. Dr VOJISLAV PAVLOVIĆ, redovni profesor u penziji, Fakultet veterinarske medicine, Beograd**
- 5. Dr STANKO BOBOŠ redovni profesor u penziji, Poljoprivredni fakultet, Departmant za veterinu, Univerziteta u Novom Sadu**

**Datum odbrane:**

## Kratak sadržaj

Jednoćelijske alge *Prototheca sp.* su mikroorganizmi značajni za veterinarsku i humanu medicinu jer više vrsta navedenog roda ima patogeni potencijal i, koliko je danas poznato, to su jedine alge koje izazivaju infekcije životinja i ljudi. Mastitis goveda izazvan prototekama je najčešći oblik prototekoze među životinjama javlja se u vidu hroničnog subkliničkog ili umerenog kliničkog mastitisa. Prototekalni mastitis goveda u najvećem broju slučajeva izaziva vrsta *P. zopfii* i to genotip 2, a znatno ređe vrsta *P. blaschkeae*. Na teritoriji Srbije zabeleženi su slučajevi mastitisa rezistentnih na antibiotski tretman u kojima je kao uzročnik potvrđena alga *P. zopfii*, ali su dosadašnja istraživanja bila ograničenog obima i nisu obuhvatila molekularno-genetičku karakterizaciju uzročnika, tako da nije poznato koji je genotip *P. zopfii* bio u pitanju. Zbog toga je bilo opravdano da se u ovoj tezi ispita prevalencija mastitisa izazvanih sa *P. zopfii* na nekim ispitivanim farmam Srbiji i izvrši molekularno-genetička karakterizacija *P. zopfii* izolovanih u slučajevima kliničkog i subkliničkog mastitisa. Od ukupno 494 uzorka mleka krava obolelih od mastitisa izazvanim algom iz roda *Prototheca*, prototeka je izolovana iz 39 uzoraka, od toga 32 uzorka su iz mleka krava koje su obolele od subkliničkih mastitisa i 7 uzoraka je iz mleka krava sa znacima kliničkog mastitisa. 4. Ukupno izolovanih algi iz roda *Prototheca* bilo je 39, od toga *Prototheca zopfii* genotip 2 identifikovana je u 37 (94,8%) izolata i samo dva izolata su potvrđena kao (5,2%) *Prototheca zopfii* genotip 1. Ukupno 25 (64,11%) izolata *P. zopfii* je bilo osetljivo na nistatin, 16 (41,03%) izolata na streptomycin, 9 (23,07%) na kanamicin i 6 (15,38%) na gentamicin, na osnovu čega se nistatin i aminoglikozidni preparati mogu preporučiti u terapiji prototekalnog mastitisa u Republici Srbiji.

Ključne reči: *Prototheca zopfii*, mastitis, krava

### **Naučna oblast i uža naučna oblast:**

Veterinarska medicina, ginekologija sa andrologijom

**UDK broj: 636.2:618.19-002:631.466**

## Summary

Onecelled algae *Prototheca sp.* are Microorganisms important for veterinary and human medicine, because more than one species of said genus has pathogenic potential and how much is known today, these are the only algae that cause infections in animals and humans. Mastitis in cattle caused by *Prototheca sp.* is the most common form of protothecosis among animals and it occurs in the form of chronic subclinical or moderate clinical mastitis. Protothecal bovine mastitis in most cases causes type *P. zopfii*, genotype 2, and much rarer type *P. blaschkeae*. In Serbia, there were cases of mastitis resistant to an antibiotic that has been caused by the algae *P. zopfii*, but previous studies were limited in scope and are not included molecular genetic characterization of the pathogen, so it is not known which genotype *P. zopfii* was concerned. Therefore it was justified that in this thesis we examine the prevalence of mastitis caused by *P. zopfii* tested on some farms in Serbia and to perform molecular genetic characterization of *P. zopfii* isolated in cases of clinical and subclinical mastitis. From a total of 494 samples of milk *Prototheca sp.* was isolated from 39 samples, of which 32 samples were from the milk of cows that are suffering from subclinical mastitis and 7 samples from the milk of cows with signs of clinical mastitis. Total isolated *Prototheca sp.* was 39, of which was identified 37 (94.8%) *Prototheca zopfii* genotype 2 and only two samples (5.2%) *Prototheca zopfii* genotype 1. A total of 25 (64.11%) of the *P. zopfii* isolates was sensitive to nystatin, 16 (41.03%) isolates was sensitive to streptomycin, 9 (23.07%) and kanamycin, and 6 (15.38%) was sensitive to gentamicin, based on these findings the aminoglycoside and nystatin preparations can be recommend for the treatment of protothecal mastitis in the Republic of Serbia.

Key words: *Prototheca zopfii*, mastitis, cow

**Scientific field and narrower scientific field:**

Veterinary medicine, gynecology and andrology

**UDC number: 636.2:618.19-002:631.466**

## Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Pregled literature.....	4
2.1. Patogeni potencijal algi roda <i>Prototheca</i> sp.....	4
2.2. Morfološke i biohemijske karakteristike vrste <i>Prototheca zopfii</i> .....	6
2.3. Mastitis goveda izazvan algom iz roda <i>Prototheca</i> .....	10
2.3.1. Osetljivost algi iz roda <i>Prototheca</i> na antimikotike i antibiotike.....	12
2.4. Etiologija i ekonomski značaj supkliničkih i kliničkih mastitisa.....	17
2.5. Mehanizmi odbrane mlečne žlezde od infekcija i značaj određivanja broja somatskih ćelija u mleku.....	22
2.5.1. Uticaj alge iz roda <i>Prototheca</i> na broj somatskih ćelija u mleka.....	25
2.6. Preventiva mastitisa izazvanih <i>Prototheca</i> spp.....	27
3. Cilj i zadaci rada.....	31
4. Materijal i metode rada.....	32
4.1. Materijal.....	32
4.2. Metode rada.....	32
4.2.1. Uzimanje uzoraka mleka, vode za napajanje, briseva poda, opreme i napajalica.....	32
4.2.2. Određivanje broja somatskih ćelija u mleku.....	33
4.2.3. Izolacija <i>P. zopfii</i> na Sabouraud dekstroznom agaru.....	35
4.2.4. Identifikacija <i>P. zopfii</i> PCR metodom.....	36
4.2.4.1. Ekstrakcija DNK alge <i>P. zopfii</i> i procena količine ekstrahovane DNK.....	36

4.2.4.2. Ekstrakcija DNK alge <i>P. zopfii</i> iz kolonija.....	36
4.2.4.3. Amplifikacija DNK <i>P. zopfii</i> koristeći duplex-PCR metodu.....	37
4.2.5. Ispitivanje osetljivosti izolata <i>Prototheca spp.</i> na antibiotike i antimikotike disk difuzionom metodom.....	38
4.2.6. Statistička analiza podataka.....	40
5. Rezultati istraživanja.....	41
5.1. Rezultati izolacije i identifikacije alge <i>Prototheca spp.</i> i broja somatskih ćelija u mleku.....	41
5.1.1. Rezultati izolacije i identifikacije alge <i>Prototheca spp.</i> .....	41
5.1.2. Rezultati broja somatskih ćelija u mleku krave i nalaz <i>Prototheca spp</i> u uzorcima mleka iz četvrti vimena krava.....	45
5.2. Rezultati identifikacije alge <i>Prototheca spp.</i> PCR tehnikom.....	53
5.3. Rezultati ispitivanja osetljivosti izolata <i>Prototheca zopfii</i> na odabrane antibiotike i antimikotike.....	54
6. Diskusija.....	56
6.1. Izolacija i identifikacija <i>Prototheca spp.</i> iz mleka i broj somatskih ćelija....	56
6.2. Osetljivost izolata <i>Prototheca zopfii</i> na odabrane antibiotike i antimikotike....	60
7. Zaključci.....	63
8. Literatuara.....	64

## 1. UVOD

Jednoćelijske alge iz roda *Prototheca* su mikroorganizmi značajni za veterinarsku i humanu medicinu jer više vrsta navedenog roda ima patogeni potencijal i, koliko je danas poznato, to su jedine alge koje izazivaju infekcije životinja i ljudi (Tsuji i sar., 2006; Lass-Flörl i Mayr, 2007; Marques i sar., 2008; Thompson i sar., 2009; Ahrholdt i sar., 2012; Min i sar., 2013; Nguyen i Rosen, 2015). Alge iz roda *Prototheca* vode poreklo od zelenih algi roda *Chlorella* sa kojima su svrstane u istu familiju Chlorellaceae. Međutim, alge *Prototheca* spp. su bezbojne jer su tokom evolucije izgubile hlorofil, a samim tim i sposobnost fotosinteze, tako da su prešle na heterotrofni saprobni način ishrane nalik gljivama. Ove ubikvitarne mikroalge se mogu naći u različitim tipovima staništa, ali najčešće su na mestima koje odlikuje velika vlažnost i prisustvo organske materije (otpadne vode, zemljišta, stajsko đubrivo).

Infekcije koje izazivaju alge iz roda *Prototheca* nazivaju se prototekoze. Među životinjama, prototekoze se najčešće javljaju kod goveda (Jánosi i sar., 2001; Malinowski i sar., 2002; Milanov i sar., 2006; Marques i sar., 2008, 2010; Jagielski i sar., 2011; Gao i sar., 2012; Ahrholdt i sar., 2012) i pasa (Hollingsworth, 2000; Stenner i sar., 2007; Tsuji i sar., 2006; Vince i sar., 2014), a veoma retko kod mačaka (Kaplan i sar., 1976; Dillberger i sar., 1988).

Najznačajnija i najčešća klinička manifestacija infekcije algama iz roda *Prototheca* je hronični mastitis goveda (Pore i sar., 1987; Buzzini i sar., 2004; Roesler i sar., 2006; Milanov i sar., 2006; Ahrholdt i sar., 2012), jer izaziva nepovratnu redukciju proizvodnje mleka, što je zabeleženo u mnogim zemljama kao što su Velika Britanija (Spalton i sar., 1985), Brazil (Costa i sar., 1996; Bueno i sar., 2006), Nemačka (Baumgärtner, 1997), Danska (Jensen i sar., 1998), Japan (Osumi i sar. 2008).

Zahvaljujući sposobnosti da inficiraju makrofage i u njima opstaju, kao i da invadiraju tkivo mlečne žlezde, alge iz roda *Prototheca* mogu da izazovu perzistentnu infekciju sa povremenim recidivima bolesti (Roesler i sar., 2003). Prototekalni mastitis goveda u najvećem broju slučajeva izaziva vrsta *Prototheca zopfii* (*P. zopfii*) genotip 2, a znatno ređe vrsta *Prototheca blaschkeae* (*P.*



*blaschkeae*) (Jagielski i sar., 2007; Roesler i sar., 2006; Möller i sar., 2007; Kishimoto i sar., 2010; Gao i sar., 2012; Ahrholdt i sar., 2012).

Mada je dostupnim metodama do sada utvrđeno postojanje samo dva genotipa *P. zopfii*, ne može se isključiti postojanje drugih genotipova ili subtipova unutar genotipa 2. Na tu pretpostavku navode veoma neujednačeni rezultati, kada je u pitanju osetljivost, odnosno rezistencija *P. zopfii* na ispitivane antimikrobne preparate. Prema podacima iz literature *P. zopfii* je izrazito rezistentna na sve poznate hemoterapeutike, koji se rutinski koriste u terapiji mastitisa, zbog čega važi pravilo da se inficirane krave moraju brzo ukloniti iz stada (Costa et al., 1997; Roesler i sar., 2001; Buzzini et al., 2008).

Neki antimikrobni preparati su u *in vitro* uslovima pokazali potencijal u suzbijanju *P. zopfii* (amfotericin, gentamicin, kanamicin i nistatin) ali su rezultati bili nekonzistentni (Milanov i sar., 2006; Gao i sar., 2012; Lopes i sar., 2008; Sobukawa i sar., 2011; Wawron i sar., 2013), zbog čega i dalje važi stav da za prototekalni mastitis ne postoji adekvatna terapija zbog visoke rezistentnosti uzročnika (Bexiga i sar., 2003; Buzzini i sar., 2004; Marques i sar., 2006; Milanov i sar., 2006; Lopes i sar., 2008; Gao i sar., 2012; Wawron i sar., 2013). Upravo zbog odsustva odgovora na terapiju, koja se rutinski primenjuje kod mastitisa (Milanov i sar., 2006; Wawron i sar., 2013), prototekoza mlečne žlezde goveda i dalje predstavlja ozbiljan problem širom sveta. Genotip 2 alge *P. zopfii* pokazuje znatno veću rezistentnost na antimikrobne preparate, u poređenju sa genotipom 1 (Sobukawa i sar., 2011). Genotip 2 *P. zopfii* je glavni uzročnik prototekalnog mastitisa (Jagielski i sar., 2007; Roesler i sar., 2006; Möller i sar., 2007; Kishimoto i sar., 2010; Gao i sar., 2012; Onozaki i sar., 2013) i u tim slučajevima ne postoji preparat koji ima dokazanu kliničku efikasnost (Sobukawa i sar., 2011; Gao i sar., 2012; Wawron i sar., 2013), zbog čega se u novije vreme ispituje efikasnost alternativnih tretmana u suzbijanju infekcije *P. zopfii* (Tortorano i sar., 2008; Marques, 2010; Grzesiak i sar., 2016).

Na teritoriji Srbije zabeleženi su slučajevi mastitisa rezistentnih na antibiotski tretman u kojima je kao uzročnik potvrđena alga *P. zopfii* (Milanov i sar. 2006; Cvetojević i sar., 2015), ali su dosadašnja istraživanja bila ograničenog obima i nisu obuhvatila molekularno-genetičku karakterizaciju uzročnika, tako da

nije poznato koji je genotip *P. zopfii* bio u pitanju, iako su rezultati ispitivanja osetljivosti izolata u prvom istraživanju (Milanov i sar., 2006) bili različiti od većine analognih ispitivanja iz drugih regiona (Bexiga i sar., 2003; Lopes i sar., 2008; Gao i sar., 2012; Wawron i sar., 2013). Zbog toga je bilo opravdano da se u ovoj tezi ispita prevalencija mastitisa izazvanih sa *P. zopfii* u Srbiji i izvrši molekularno-genetička karakterizacija *P. zopfii* izolovanih u slučajevima mastitisa.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Patogeni potencijal algi roda *Prototheca*

Alge roda *Prototheca* mogu izazvati infekcije kod različitih životinja iz klase sisara, kao i kod ljudi. Infekcije navedenim algama zovu se prototekoze i među životinjama se najčešće javljaju kod goveda i praćene su akutnim do hroničnim granulomatoznim mastitisom. Mastitis izazvan algama *Prototheca* sp. naziva se prototekalni mastitis i praćen je smanjenjem proizvodnje mleka i često naknadnom atrezijom inficirane četvrti (Roesler i Hensel, 2003).

Kod malih životinja, odnosno kod pasa (Hollingsworth, 2000; Tsuji i sar., 2006; Stenner i sar., 2007) i mačaka (Kaplan i sar., 1976; Dillberger i sar., 1988), prototekoza se najčešće manifestuje u vidu dermatitisa (Ahrholdt i sar., 2012), mada su kod pasa opisani i slučajevi meningoencefalitisa (Le Roux i sar., 2013) i okularnih infekcija (Shank i sar., 2015).

Kod ljudi se prototekoza može ispoljiti u vidu različitih kliničkih formi: (i) dermatitis; (ii) zapaljenje serozne kese vrha lakta *bursitis olecrani* i (iii) diseminovane ili sistemske infekcije (Krcméry, 2000; Lass-Flörl i Mayr, 2007; Lu i sar., 2012; Ahrholdt i sar., 2012; Nguyen i Rosen, 2015). Opisan je i slučaj prototekalnog meningitisa kod pacijenta sa sindromom stečene imunodeficijencije (Kaminski i sar., 1992), a opisan je i slučaj atipične kliničke slike sistemske prototekoze, gde je hepatitis bio klinička manifestacija diseminovane prototekalne infekcije (Min i sar., 2013).

Obzirom da su alge *Prototheca* spp. široko rasprostranjene, a da se retko beleže slučajevi prototekoze, smatra se da imaju nizak patogeni potencijal i da je oslabljen imunitet, tačnije poremećaj u funkciji neutrofila predisponirajući faktor za razvoj kliničkih infekcija (Lass-Flörl i Mayr, 2007; Ahrholdt i sar., 2012).

Rod *Prototheca* obuhvata više vrsta, ali tačan broj još uvek nije definitivno određen. Većina naučnika prihvata postojanje sledećih šest vrsta: *Prototheca wickerhamii* (*P. wickerhamii*), *Prototheca zopfii* (*P. zopfii*), *Prototheca blaschkeae* (*P. blaschkeae*), *Prototheca stagnora* (*P. stagnora*), *Prototheca ulmea* (*P. ulmea*) i *Prototheca cutis* (*P. cutis*) (Roesler i sar., 2006; Satoh i sar., 2010).

Za tri vrste (*P. wickerhamii*, *P. zopfii* i *P. blaschkeae*) je dokazano da imaju patogeni potencijal, odnosno sposobnost da izazivaju prototekoze kod životinja i ljudi (Kaminski i sar., 1992; Hollingsworth, 2000; Krcméry, 2000; Jánosi i sar., 2001; Malinowski i sar., 2002; Tsuji i sar., 2006; Milanov i sar., 2006; Jagielski i Lagneau, 2007; Stenner i sar., 2007; Lass-Flörl i Mayr, 2007; Marques i sar., 2008; Thompson i sar., 2009; Jagielski i sar., 2011; Ahrholdt i sar., 2012; Lu i sar., 2012; Min i sar., 2013; Vince i sar., 2014; Nguyen i Rosen, 2015).

Prototekozu kod pasa izazivaju vrste *P. wickerhamii* i *P. zopfii* (Hollingsworth, 2000; Tsuji i sar., 2006; Stenner i sar., 2007; Ahrholdt i sar., 2012; Vince i sar., 2014). Klinički znaci prototekoze kod pasa nisu specifični, jer su opisane kožne, očne, crevne i sistemske infekcije izazvane prototekama. Najčešće je bolest pritajena i u momentu postavljanja dijagnoze diseminovana po čitavom telu. Infekcija zahvata gastrointestinalni trakt, pre svega kolon, ali i centralni nervni sistem, naročito oči, tako da se klinički najčešće manifestuje u vidu hemoragičnog kolitisa, hronične dijareje i akutnog slepila. U kasnijim stadijumima bolesti, infekcija se širi i na srce, bubrege, limfne čvorove, skeletne mišiće i jetru. Do danas nije pronađen efikasan lek za prototekozu kod pasa, te se bolest najčešće završava fatalnim ishodom (Hollingsworth, 2000; Stenner i sar., 2007; Sapieryński i Jaworska, 2008; Vince i sar., 2014).

Kod ljudi se infekcije *Prototheca* spp. algama izuzetno retko dešavaju, pri čemu je najčešći uzročnik vrsta *P. wickerhamii* (Kaminski i sar., 1992; Krcméry, 2000; Jagielski i Lagneau, 2007; Lass-Flörl i Mayr, 2007; Lu i sar., 2012). Sve vrste za koje je dokazan patogeni potencijal kod životinja (*P. wickerhamii*, *P. zopfii* i *P. blaschkeae*) mogu izazvati prototekozu kod ljudi (Roesler i sar., 2006; Lass-Flörl i Mayr, 2007; Ahrholdt i sar., 2012; Min i sar., 2013; Nguyen i Rosen, 2015), a nedavno je opisan i slučaj pacijenta kod koga je četvrta vrsta *P. cutis* izazvala dermatitis (Satoh i sar., 2010). U najvećem broju slučajeva sistemskih prototekalnih infekcija kod ljudi i pasa uzročnik je *P. zopfii* genotip 2. Osim toga, taj genotip *P. zopfii* može biti zoonotski patogen. Druga vrsta, *P. wickerhamii* verovatno u većoj meri izaziva kožne infekcije (Ahrholdt i sar., 2012). Na osnovu biohemijskih, seroloških i filogenetskih analiza *P. zopfii*, utvrđeno je postojanje dva genotipa ove vrste, pri čemu se genotip 1 smatra nepatogenim, a genotip 2 je

povezan sa mastitisom kod goveda i prototekoza kod ljudi (Jagielski i sar., 2007; Roesler i sar., 2006; Möller i sar., 2007; Kishimoto i sar., 2010; Gao i sar., 2012). Drugim rečima, genotip 2 *P. zopfii* zauzima značajno mesto u epidemiologiji prototekalnih infekcija kod životinja i ljudi širom sveta (Ahrholdt i sar., 2012).

## **2.2. Morfološke i biohemijske karakteristike vrste *Prototheca zopfii***

Dijagnostika infekcija prototekama se obično postavlja na osnovu identifikacije makroskopskih i mikroskopskih karakteristika i procene rasta na selektivnim podlogama (Malinowski i sar., 2002; Rodriguez, 2003). Laboratorijska diferencijacija između različitih vrsta algi iz roda *Prototheca spp.* može biti složena pa se diferencijacija bazira na makroskopskim i mikroskopskim analizama, rastu na različitim temperaturama i podlagama sa dodatkom alkohola i šećera (Rodriguez, 2003).

Vrste iz roda *Prototheca spp* mogu biti aerobni i mikroaerobni mikroorganizmi, i rastu u aerobnim uslovima na nekoliko standardnih medijuma kao što su Columbia agar sa dodatkom 5% ovčije krvi, Sabouraud dekstrozni agar i Brain herat infusion bujon (Janosi i sar., 2001). Na navedenim podlogama ove alge uglavnom rastu kao bele do sive, mutne, pastozne nehemolitične kolonije koje podsećaju na kolonije kvasaca dijametra 0,5 cm do 1 cm, nakon 24-72 h inkubacije na temperturi od 25-37 °C (Malinowski i sar., 2002; da Costa i sar., 2004). Na Sabouraud dekstroznom agaru kolonije podsećaju na kvace belo do sive boje, suve i kremaste konzistencije, sa granuliranom površinom i mirisom podsećaju na kvasac, nakon 24-72h inkubacije na temperturi od 25-37 °C (DiPersio, 2001., Malinowski i sar., 2002).

Inkubacija na 37 °C je adekvatna za rast većine *Prototheca spp*, dok neki spororastući sojevi zahtevaju inkubaciju na 25°C tokom 7 dana. *P. wickerhamii* stvara glatke kolonije slične kvascima, koje podsećaju na *Candida albicans*, i dužom inkubacijom produkuje taman pigment. Kolonije *P. zopfii* rastu brže i za razliku od *P. wickerhamii* kolonije su veće i uvijenih ivica, nakon 48h na

Sabouraud dekstroznom agaru, i dužom inkubacijom produkuju svetlo žuti pigment. Kolonije *P. blaschkeae* su glatke, konveksne i male beličaste boje a površina kolonija je meka i viskozna (DiPersio, 2001., Malinowski i sar., 2002, Janosi i sar., 2001.)

*Prototheca spp.* mogu biti diferencirane od bakterija i gljivica na osnovu njihove veličine, oblika, načina razmnožavanja (DiPersio, 2001.) Diferencijacija unutar vrste može se utvrditi na osnovu veličine i broja spora (Rodriguez, 2003). Okrugle ili ovalne ćelije prototeka sa endosporama nedvosmisleno se mogu identifikovati na mikroskopskom preparatu (Thiele i Bergmann, 2002). Razmazi izolovanih prototeka obojenih metilen plavim ili po Gramu na mikroskopskom preparatu (uveličanju x1000) se mogu videti kao velike (8-25 $\mu$ m), sferične ili ovalne ćelije sa obojenim centralnim regionom sa ili bez endospora. Prototeka je eukariotski jednoćeliski organizam i po Gramu se boji plavo iako ne poseduje građu zida prokariota, odnosno Gram pozitivnih bakterija. Sporangije *P. zopfii* su veće i više ovalnog i cilindričnog oblika nego kod *P. blaschkeae* i *P. wickerhamii* (DiPersio, 2001.; Janosi i sar., 2001). Tačnije, sporangija *P. zopfii* je sferična (15-30  $\mu$ m) ili elipsoidnog oblika (11-20  $\mu$ m x 14-23  $\mu$ m). Oslobođene sporangiospore imaju granuliranu citoplazmu sferičnog (4,5-15  $\mu$ m) ili elipsoidnog oblika od (3-7  $\mu$ m x 5-8  $\mu$ m), a razvojna forma između spore i novog sporangijuma („Dauer“ ćelija) je takođe sferičnog oblika (8,5-14  $\mu$ m) ili elipsoidnog oblika od (6-11  $\mu$ m x 8,5-13  $\mu$ m). Hematoksilin eozin bojenje ima organsku upotrebu u identifikaciji *Prototheca spp.* jer se ćelije ne boje homogeno (Leimann i sar., 2004). Nakon identifikacije *Prototheca spp.* na bazi izgleda kolonija i morfologije ćelija neophodno je ispitati i biohemijske analize u koje spadaju ispitivanje sposobnosti razgradnje različitih šećera i alkohola, kao i osetljivost na klotrimazol i druge preparate (Padhye i sar. 1979). Sve prototeke razlažu glukozu kao izvor ugljenika kao i amonijum soli kao izvor azota, ali nisu sposobni da razlažu ureu i nitrate, a potreban im je kiseonik i tiamin za rast (Janosi i sar., 2001). Dodatno, većina prototeka ne razlaže saharozu i ksilozu, ali *Prototheca stagnora* ima mogućnost razlaganja saharoze posle dugog perioda inkubacije (Lass-Florl i Mayr, 2007). Postoje komercijalni identifikacioni sistemi za identifikaciju gljivica a koje se mogu koristiti za identifikaciju prototeka kao što su API 20C (Padhye i sar.

1979), RapID Yeast Plus (Espinel –Ingrof i sar. 1998) i Vitek (el-Zaatari i sar. 1990). Prototeke nisu fermentativni mikroorganizmi i mogu se diferencirati u zavisnosti od mogućnosti razlaganja šećera. Tri patogene vrste se mogu diferencirati na osnovu sposobnosti razlaganja ugljenika poreklom iz šećera. *P. wickerhamii*, *P. zopfii* i *P. blaschkeae* razlažu glukozu i galaktozu, dok prve dve razlažu i glicerol. *P. blaschkeae* razlaže glukozu i galaktozu, a ne razlaže glicerol. *P. wickerhamii* jedino razlaže trehalozu i smatra se da je to ključ njihove međusobne diferencijacije (Roesler i sar. 2006.; Marques i sar. 2010) (Tabela 1).

Tabela 1. Morfološke i biohemijske karakteristike roda *Prototheca* spp. (adaptirano iz Janosi i sar. 2001., Moller i sar. 2007 i Marques i sar. 2010)

	<i>P. wickerhamii</i>	<i>P. zopfii</i>	<i>P. blaschkeae</i>	<i>P. stagnora</i>
Izgled kolonija	Okrugla, ravna sa glatkim ivicama	Ravna, gruba, centralno uzvišenje, neravne ivice	Ravna, centralno uzvišenje, neravne ivice	ravna sa glatkim ivicama
Veličina ćelija	4-10 mm	7-30 mm	NI	7-14 mm
Asimilacija glicerola	+	+	-	+
Galaktoze	+	(+)	+	+
Saharoze	-	-	-	+
Trehaloze	+	-	-	-
n-propanola	-	+	NI	-
arginina	+	+	+/-	+
lizina	+	+	-	NI
Rast na 37°C	+	+	+	-

- ne koriste, (+) varijabilno, + koriste, NI nema informacija

*P. zopfii* biotip 3 je na osnovu pokazanih karakteristika izdvojen kao nova vrsta i to *P. blaschkeae*. *P. zopfii* biotipovi 1 i 2 su označeni kao genotip 1 i 2 (Roesler i sar. 2006). Isti autori (Roesler i sar. 2006) su izvršili opsežne fenotipske analize iz kojih su dobijeni standardi za identifikaciju *P. zopfii* i predložena tri biotipa (Tabela 2).

Tabela 2. Diferencijacija dva genotopa *P. zopfii* i *P. blaschkeae* (raniji naziv *P. zopfii* genotip 3) (adaptirano iz Janosi i sar. 2001., Roesler i sar. 2006., Moller i sar. 2007., Marques i sar. 2010 i Ricchi i sar. 2010.)

	<i>P. zopfii</i> genotip 1	<i>P. zopfii</i> genotip 2	<i>P. blaschkeae</i>
Veličina sporangiofora (µm)	11-30	5-15	NI
Izgled ćelija	Sferični/cilindrični	Sferični/cilindrični	Sferični
Galaktoza	++	(+)	+
Glicerol	+++	+++	-
Lizin	-	+	-
pH tolerancija	2,4-9,5	2,1-12	3,0-12
NaCl tolerancija	4%	9%	18%
Rast na 37°C	+	+	+

Nema razlaganja, (+) varijabilno, + slabo razlaganje, ++umereno razlaganje, +++jako razlaganje

Novootkriveni termotolerantni soj *P. zopfii* var *hydrocarbonea* je izolovan sa izvora tople vode. Rast ovog soja se odvija na 25 °C i 40°C pri čemu na temperaturama od 37 °C i 40 °C dolazi do produkcije gasa poreklom glukoze i saharoze (Ueno i sar. 2002). Tokom fermentacije na 25°C nastaju podjednake količine mlečne kiseline i etanola, visoke koncentracije CO<sub>2</sub> i male količine sirćetne kiseline. Na temperaturi od 40°C u početnim stadijumima fermentacije ne postoji produkcija mlečne kiseline dok su koncetracije etanola i CO<sub>2</sub> veće nego na 25°C (Ueno i sar. 2002). Određeni sojevi *P. zopfii* imaju sposobnost da razgrađuju različite tipove alifatičnih hidrokarbonskih jedinjenja. Ova karkateristika omogućava da se ovi sojevi prototeka koriste za biodegradaciju alifatičnih hidrokarbonskih jedinjenja u okruženju (Vigna i sar. 2002). *P. zopfii* ima sposobnost da razgradi 10% motornog ulja i 40% petroleja, dok *P. zopfii* var *hydrocarbonea* može da podnese velike promene pH i saliniteta tokom rasta u petrolej hidrokarbonatima (Vigna i sar. 2002).



### **2.3. Mastitis goveda izazvan algom iz roda *Prototheca***

Mastitisi goveda, izazvani algama iz roda *Prototheca* su prevalentni oblik prototekoze među životinjama i najčešće se javlja u vidu hroničnog supkliničkog ili umerenog kliničkog zapaljenskog procesa mlečne žlezde. Kod najčešćeg, hroničnog prototekalnog mastitisa, nema promene opšteg stanja krave, slabo su izraženi simptomi mastitisa, ali je povećan broj somatskih ćelija u mleku i smanjen procenat mlečne masti. Akutne mastitise obično prati prisustvo gnoja, veliki broj algi, epitelnih ćelija i makrofaga u sekretu mlečne žlezde. Akutni mastitisi izazvani algama prelaze najčešće u hroničnu formu mastitisa. Krave obolele od ovih mastitisa ne reaguju na antibiotsku terapiju, mleko nije uvek promenjeno, a broj somatskih ćelija prelazi milion u mililitru mleka. Mastitisi izazvani algama iz roda *Prototheca* dovode do lokalnog i sistemskog imunskog odgovora u zavisnosti od faze infekcije. Kod krava sa akutnom infekcijom u mleku i serumu se može utvrditi visok nivo specifičnih imunoglobulina IgG klase. Koncentracija IgA klase u mleku krava sa hroničnim infekcijama je viša nego kod krava sa akutnim infekcijama. Koncentracija specifičnih antitela u mleku i serumu krava sa hroničnim infekcijama i pozitivnim mikrobiološkim nalazima je znatno viša nego kod krava koje su hronično inficirane ali sa negativnim mikrobiološkim nalazom (Roesler i sar. 2003., Roesler i sar. 2001). Mastitisi izazvani algama predstavljaju ekonski problem, prvenstveno zato što je lečenje neizvesno, teško i dugotrajno. Incidencija mastitisa izazvanih algama iz roda *Prototheca* se stalno povećava, pa se ovim mastitisima pridaje sve više pažnje, ne samo zbog ekonomskih gubitaka, nego i zbog uticaja na javno zdravlje (Jánosi i sar., 2001; Roesler i Hensel, 2003).

Prvi slučaj infekcije algom *Prototheca* spp. opisan je 1952. godine u slučaju mastitisa krava (Lerche, 1952). Nakon toga, tokom dugog niza godina u svim analiziranim slučajevima prototekalnog mastitisa identifikovana je samo *P. zopfii* (Jensen i sar., 1998; Jánosi i sar., 2001; Roesler i sar., 2003; Möller i sar.,

2007; Osumi i sar. 2008) zbog čega se u literaturi i dalje često navodi da je *P. zopfii* glavni uzročnik prototekalnog mastitisa goveda (Ahrholdt i sar., 2012).

Danas se zna da mastitis kod krava mogu da izazovu i druge vrste iz roda *Prototheca*. *P. blaschkeae* su prvi put opisali Roesler i saradnici (2006). Kao uzročnik mastitisa krava prvi put je dokazana u Portugaliji (Marques i sar., 2008; Thompson i sar., 2009), a zatim u Poljskoj (Jagielski i sar., 2011), Nemačkoj (Ahrholdt i Roesler, 2011; Ahrholdt i sar., 2012) i Italiji (Capra i sar., 2014). Ahrholdt i saradnici (2012) smatraju da učestalost vrste *P. blaschkeae* kao uzročnika kliničkog ili supkliničkog mastitisa goveda (8.8% slučajeva) nameće potrebu daljih epidemioloških proučavanja u cilju razjašnjenja uloge ove vrste algi u razvoju navedene bolesti. *P. wickerhamii* je dokazana kao uzročnik mastitisa kod bivolica (Capra i sar., 2014).

Vrste *P. zopfii* i *P. blaschkeae* dovode do velikih ekonomskih gubitaka zbog toga što izazivaju mastitis koji je rezistentan na antimikrobne preparate (Costa i sar., 1996; Bueno i sar., 2006; Marques i sar., 2008; Thompson i sar., 2009). U neuporedivo većem broju slučajeva prototekalnog mastitisa kod goveda (preko 90% slučajeva) izolovana je *P. zopfii* i to genotip 2, koji se smatra glavnim etiološkim agensom ove bolesti, (Jagielski i sar., 2007; Roesler i sar., 2006; Möller i sar., 2007; Kishimoto i sar., 2010; Gao i sar., 2012; Onozaki i sar., 2013).

Kod većine životinja inficiranih algom *P. zopfii*, aktivnošću imunološkog sistema, kao i delovanjem antimikotika i antibiotika upotrebljenih u terapiji nije došlo do eliminacije algi iz mlečne žlezde, pa su te krave postale perzistentni ili povremeni rezervoari bolesti (Roesler i Hensel, 2003). Nedavno je utvrđeno da je *P. zopfii* sposobna da formira biofilm što doprinosi njenoj perzistenciji u okruženju mlečnih krava (Gonçalves i sar., 2015) i verovatno doprinosi teškoćama u eradikaciji ove alge i predstavlja jedan od razloga učestalih perzistentnih infekcija.

Prototekalne infekcije se mogu dijagnostikovati patohistološkim pregledom ili egzaktnije, izolacijom uzročnika, mada se od kvasaca ne mogu razlikovati samo na osnovu kulturnih osobina. Definitivna dijagnoza postavlja se testom asimilacije ugljenh hidrata. Problem kod ovih infekcija je što se na njih retko posumnja i nisu predmet rutinske laboratorijske prakse. Identifikacija vrsta

roda *Prototheca* obično se obavlja pomoću makroskopske i mikroskopske morfološke karakterizacije, određivanja biohemijskog profila i metodama molekularne karakterizacije (Roesler et al., 2003; Marques et al., 2006, 2008, 2010a). Uopšteno, asimilacija ili odsustvo asimilacije nekih substrata kao što su trehaloza, glicerol, galaktoze, arginin i lizin, su veoma dobro poznati kao ključni faktori u karakterizaciji vrsta iz roda *Prototheca* (Roesler et al., 2003).

### **2.3.1. Osetljivost algi iz roda *Prototheca* na antimikotike i antibiotike**

Za terapiju prototekoze ni u humanoj ni u veterinarskoj medicini nema definisanog farmakološkog protokola. Tako ni za prototekalni mastitis ne postoji univerzalni i efikasni lek zbog visoke rezistentnosti uzročnika (Bexiga i sar., 2003; Buzzini i sar., 2004, 2008; Marques i sar., 2006; Milanov i sar., 2006; Lopes i sar., 2008; Gao i sar., 2012; Wawron i sar., 2013). U praksi se za terapiju koristi nekoliko antigljivičnih agenasa sa različitim efektom. Tamo gde je moguće, s obzirom na lokalizaciju, tretman izbora je hirurška ekscizija. Kod pacijenata sa lokalizovanom infekcijom prognoza je dobra i obično se postiže izlečenje. Prognoza kod pacijenata sa drugim oboljenjima i imunosupresijom manje je predvidiva i može biti loša. Osetljivost *Prototheca* spp. na antifungalne agense *in vitro* ne mora biti u korelaciji sa efikasnošću *in vivo*. Istraživanja su pokazala da u *in vitro* uslovima neki preparati deluju sa efikasnošću preko 80% na *P. zopfii*: amfotericin B (Marques i sar., 2006; Milanov i sar., 2006; Gao i sar., 2012), gentamicin i kanamicin (Lopes i sar., 2008; Sobukawa i sar., 2011; Wawron i sar., 2013) i nistatin (Marques i sar., 2006; Milanov i sar., 2006; Gao i sar., 2012; Wawron i sar., 2013). Neki antibakterijski i antifungalni preparati pokazali su u nekim slučajevima umerenu efikasnost, dok je većina bila potpuno neefikasna u svim istraživanjima. U tu većinu spadaju penicilin, ampicilin, amoksicilin, tetraciklin, enrofloksacin, linkomicin, ceftriakson, novobiocin, flucitozin, cefoperazon, cefaleksin, oksitetraciklin, flukonazol, itrakonazol, klotrimazol, ekonazol i mikonazol, jer su prema dostupnim podacima iz literature,

svi izolati *P. zopfii* alge bili visoko rezistentni na njih (McDonald i sar., 1984; Milanov i sar., 2006; Lopes i sar., 2008; Wawron i sar., 2013).

Međutim, kada su u pitanju preparati koji u nekim istraživanjima pokazu dobru ili umerenu efikasnost, najčešće su rezultati neponovljivi ili čak potpuno suprotni kada isti preparat ispita drugi istraživački tim na izolatima iz drugog regiona ili države. Tako su na primer na kanamicin bili rezistentni svi izolati *P. zopfii* koji su doveli do izbijanja hroničnog endemskog mastitisa na farmi mlečnih krava u Vojvodini (Milanov i sar., 2006), dok je isti lek pokazao visoku *in vitro* efikasnost na alge iste vrste u Americi (McDonald i sar., 1984), Portugaliji (Bexiga i sar., 2003) i Poljskoj (Wawron i sar., 2013).

Slično je sa streptomycinom na koga su potpuno bili rezistentni uzorci iz Amerike (McDonald i sar., 1984) i svi izolati *P. zopfii* sa farme u Vojvodini (Milanov i sar., 2006), dok je u drugim državama pokazao određenu *in vitro* efikasnost, odnosno nisku u Poljskoj (Malinowski i sar., 2002), a veoma visoku u Kini (Gao i sar., 2012). Takođe, kada je u pitanju efikasnost gentamicina, zabeležene su razlike od slučaja do slučaja, jer je utvrđeno njegovo slabo dejstvo na *P. zopfii* u Poljskoj kada je sprovedeno opsežno istraživanje uzoraka mleka od 4.850 krava pre 14 godina (Malinowski i sar., 2002), umerena osetljivost *P. zopfii* sa farme u Vojvodini (Milanov i sar., 2006), a visoka efikasnost na izolate iste vrste algi u *in vitro* analizama uzoraka iz Amerike (McDonald i sar., 1984), Portugalije (Bexiga i sar., 2003) i Poljske (Wawron i sar., 2013).

Ispitujući osetljivost 27 izolata *P. zopfii* na antibiotike i antimikotike Wawron i sar. (2013) su utvrdili da su svi izolati rezistentni na klotrimazol, flukonazol, ekonazol, flucitozin, cefoperazon, cefaleksin, enrofloksacin, linkomicin i oksitetraciklin. Najveću osetljivost su utvrdili na nistatin kod 24 (88,9%) izolata. Manji broj izolata *P. zopfii* 14 (51,9%) je bio osetljiv na ketokonazol. Intermedijarnu osetljivost na ketokonazol su utvrdili kod 6 (22,2%) izolata, a rezistentnciju kod 7 (25,9%) izolata. Nijedan izolat nije bio osetljiv na amfotericin B, intermedijarnu osetljivost su utvrdili kod 13 (48,1%) izolata, a 14 (51,9%) izolata je bilo rezistentno na navedeni preparat. Svi izolati *P. zopfii* su u ovoj studiji bili rezistentni na amoksicilin sa klavulonskom kiselinom, cefoperazon, cefaleksin, enrofloksacin, linkomicin i oksitetraciklin. Veliki broj

izolata je bio osetljiv na gentamicin 26 (96,3%) i kanamicin 25 (92,6%) izolata. Intermedijarnu osetljivost na gentamicin i kanamicin su utvrdili kod jednog izolata, i rezistenciju na kanamicin kod samo jednog izolata. Manju osetljivost su utvrdili na polimiksin B kod 16 (59,3%) izolata, intermedijarnu osetljivost kod 9 (33,35) a dva izolata (7,4%) su bila rezistentna na navedeni preparat.

Ispitujući osetljivost na neomicin izolata *P. zopfii*, poreklom iz Amerike, McDonald i saradnici (1984) su utvrdili da su svi izolati rezistentni na neomicin. Slabiju efikasnost neomicina na *P. zopfii* poreklom iz Poljske u *in vitro* studiji su utvrdili Malinowski i saradnici (2002), a umerenu efikasnost su utvrdili Milanov i saradnici (2006) ispitujući osetljivost izolata *P. zopfii* poreklom iz uzoraka mleka uzetih iz četvrti vimena krava na farmama u Vojvodini. Sobukawa i saradnici (2011) smatraju da su velike razlike u efikasnosti antibiotika i antimikotika na alge *P. zopfii* posledica različitih genotipova ove vrste algi. Ovo svoje mišljenje potvrđuju rezultatima dobijenim ispitivanjem osetljivosti na amfotericin B, gentamicin i kanamicin, kada su utvrdili da su izolati *P. zopfii* genotip 1 osetljiviji na amfotericin B, gentamicin i kanamicin nego izolati *P. zopfii* genotip 2.

U studiji ispitivanja osetljivosti algi iz roda *Prototheca* Bouari i sar. (2011) su utvrdili da su svi (20) izolati, osetljivi na amfotericin B i ketokonazol, a rezistentni na itrakonazol.

Ispitivanjem osetljivosti 38 izolata *Prototheca* spp. na antibiotike i antimikotike Lopes i saradnici (2008) su utvrdili da su svi izolati rezistentni na penicilin, ampicilin, amoksicilin, neomicin, streptomycin, flukonazol, itrakonazol, klotrimazol, ekonazol i mikonazol. Osetljivost *Prototheca* spp. su dokazali kod 77,8% izolata na ketokonazol, kod 44,4% na nistatin i kod 11,1% na amfotericin B.

Iz uzoraka mleka krava sa smanjenom sekrecijom mleka Lassa (2007) je izolovao alge iz roda *Prototheca*. Ispitivanjem osetljivosti na antibiotike i antimikotike 168 izolata utvrdio je da je 90% izolata rezistentno na itrakonazol, flukonazol, tiokonazol, klotrimazol, ketokonazol, mikonazol, 5-fluorocitozin i pimaricin. Osetljivost izolata algi iz roda *Prototheca* je utvrdio prema antimikoticima nistatinu (oko 80 %) i amfotericinu B (ispod 20%) i,

antibioticima gentamicinu kod 73,8% izolata i kanamicinu kod 68,5% izolata. Svi izolati su bili rezistentni na penicilin, tetraciklin, amoksicilin, linkomicin, cefoperazon i novobiocin.

Testovi oseljivosti *Prototheca* spp. na antimikotike pokazali su rezistenciju na flukonazol i kaspofungin, a osetljivost na amfotericin B, flukonazol, vorikonazol i posakonazol. Osetljivost prema polienima i azolnim preparatima se može objasniti prisustvom ergosterola u neutralnoj lipidnoj frakciji ćelijskog zida *Prototheca* spp. (Tortorano i sar. 2008). Mehanizam delovanja azola i polienina se zasniva na inhibiciji enzima citohrom P450 3A (CYP 3A) koji je odgovoran za konverziju lanosterola u ergosterol. Kao posledica blokiranja biosinteze ergosterola dolazi do nakupljanja toksičnih produkata i promene permeabilnosti plazma membrane što dovodi do inhibicije rasta i smrti ćelije (Tortorano i sar. 2008). Na osnovu istraživanja osetljivosti izolata *Prototheca* spp. na jodne i heksidinske preparate Krukowski i sar. (2013) utvrđuju osetljivost na ove preparate i savetuju njihovu upotrebu u dezinfekciji sisa pre muže u cilju prevencije prototekalnog mastitisa. Jagielski i sar. (2012) ispitao je minimalnu inhibitornu koncentraciju (MIC) na veći broj antigljivičnih lekova, i kao preparat izbora jeste amfotericin B koji autor i preporučuje kao lek izbora kod infekcije mlečne žlezde sa *Prototheca* spp, jer je kod 97% izolata inhibiran rast bio ispod 2 mg/L. Marques i saradnici (2006) navode da je nistatin pokazao visoki stepen efikasnosti (MIC 1,953) prema izolatima *P. zopfii* i *P. wickerhamii*, a amfotericin B visoku efikasnost prema *P. zopfii* (MIC<sub>90</sub> 1,953) a slabiju prema *P. wickerhamii* (MIC<sub>90</sub> 7,812). Amfotericin B i pimaricin su pokazali visoku efikasnost prema izolatima *P. zopfii* (MIC<sub>90</sub> 4 i 8 μg/mL), dok su vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije bile dva do četiri puta veće (MIC<sub>90</sub> 2-32 μg/mL) (Buzzini i sar. 2008).

U Srbiji je prvi put pre 10 godina potvrđeno prisustvo *P. zopfii* na jednoj farmi mlečnih krava u Vojvodini (Milanov i sar. 2006) kada je ova alga izolovana iz 22 uzorka (30,13%). Identifikacija izolata izvršena je na osnovu karakteristika rasta, mikroskopskog izgleda, biohemijskih osobina i antimikrobne osetljivosti. Prototekalne infekcije mlečne žlezde su kod 19 jedinki rezultirale klinički manifestnim mastitisom hroničnog toka, a patohistološki izrazitom

granulomatoznom proliferacijom intersticijuma mlečne žlezde. Takođe je ispitana osetljivost izolata *in vitro* na antibiotske i antifungalne agense obzirom na rezistenciju mastitisa na primenjene antibiotske tretmane i utvrđena osetljivost na nistatin i amfotericin B, umerena osetljivost na polimiksin B, gentamicin i neomicin, ali i rezistencija na kanamicin, enrofloksacin, ceftriakson, streptomycin, amoksicilin, tetraciklin, penicilin, linkomicin i novobiocin. Nedavno je opet na jednoj farmi dokazana *P. zopfii* u 6 uzoraka (15,4%) i to kod četiri krave sa supkliničkim i kod dve sa kliničkim mastitisom. Za identifikaciju *P. zopfii* korišćene su mikološke, histopatološke i molekularne metode (Cvetojević i sar., 2015).

Drugi pristup lečenju mastitisa izazvanim *Prototheca* spp opisao je u svom radu Bergmann (1993). Autor je veštački inficirao sve četiri četvrti krave sa prototekama u količini od  $2 \times 10^8$ , i ispitivao je efekat levamizol hidrohlorida. Preporučena doza preparata levamizola bila je u količini od 25 do 40 ml u svaku četvrt, posle muže u trajanju od najmanje 3 dana, dok ukupna doza levamizola neprelazi 6 gr (15 mg/kg TM). Kod intramamarne aplikacije levamizola u dozi od 30 ml po četvrti (3mg/kg) period inhibicije rasta prototeke bio je 6h, a aplikacija od 200 ml po četvrti produžava ovo vreme do 36h. Veća aktivnost levamizol hidrohlorida nego nistatina prema *P. zopfii* i *Candida albicans* utvrđena je *in vitro* (Bergmann, 1987). Ishikawa i Shimizu (1983) zapžaju da se aplikacijom levamizola povećava broj B limfocita u mleku u istom odnosu kao i u perifernoj krvi. Endotoksemični mastitisi smanjuju zastupljenost B limfocita u mleku i krvi i ovo smanjenje rezultuje opštem smanjenju B limocita. Na osnovu ovih zapažanja autori sugerišu potencijalnu ulogu i primenu levamizola u kontroli mastitisa. Prirodni ekstrakt semena limuna u koncentraciji 1: 500, i isti ekstrakt 1: 200 rastvoren u fiziološkom rastvoru, sadrže 1: 30000 timerasola korišćenog kao konzervans, aplikovan intramamarno u dozi od 20 ml po četvrti dnevno u trajanju 15 dana, pokazao je pozitivno delovanje na imunski sistem mlečne žlezde (Brito i sar. 1997).

## **2.4. Etiologija i ekonomski značaj supkliničkih i kliničkih mastitisa**

Dosadašnja ispitivanja pokazala su da bakterije imaju vodeću ulogu u etiologiji infektivnih mastitisa, mada su iz mlečne žlezde krava sa mastitisom izolovane i druge vrste mikroorganizama. Do sada je izolovano preko 130 različitih mikroorganizama (bakterije, mikoplazme, gljivice, hlamidije, alge i virusi), ali je ograničeni broj njihovih vrsta obuhvaćen standardnim laboratorijskim analizama uzoraka mleka, na osnovu dokaza o njihovoj ulozi u izazivanju mastitisa. Mikroorganizmi mogu izazvati patološki proces u mlečnoj žlezdi samostalno, a mogu sa drugim faktorima dovesti do komplikacija u njihovom toku (Milanov i Stojanović, 2010). Značajne razlike koje postoje među mikroorganizmima u pogledu značaja u etiologiji mastitisa proističu iz njihove sposobnosti preživljavanja u spoljašnjoj sredini, kolonizacije sisnog kanala, adherencije na epitelne ćelije mlečne žlezde (posebno sisnog kanala i cisterne) tako da se ne ispiraju tokom muže krava, stepena invazivnosti, tj. sposobnosti daljeg prodora u parenhim vimena (streptokoke su manje invazivne od stafilokoka), preživljavanja u organizmu (odbrana od fagocitoze, rezistencija na antibiotike) i produkcije toksina. U najvećem broju slučajeva, infekcije vimena nastaju galaktogeno (preko sisnog kanala), ređe hematogenom ili limfogenom diseminacijom uzročnika sa drugih mesta primarne infekcije u organizmu (Boboš i Vidić, 2005). Sa epizootiološkog stanovišta, uobičajeno je da se uzročnici mastitisa dele na kontagiozne i one koji su poreklom iz životne sredine. Podela je pre svega didaktička, jer ukazuje na glavni izvor i glavni način širenja infekcije. Kontagiozni mikroorganizmi su adaptirani na život u organizmu domaćina (u mlečnoj žlezdi), pa je glavni izvor infekcije vime, a prenošenje infekcije sa krave na kravu se dešava tokom muže. To ne znači da se uzročnici mastitisa poreklom iz okruženja ne mogu preneti na isti način, ali ukazuje na to, da je taj put širenja infekcije od malog značaja u odnosu na stalnu ekspoziciju vimena ovim uzročnicima u životnom okruženju (Milanov i Stojanović, 2010).



Kontagiozni mastitis izazivaju *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* i *Mycoplasma* spp. Kontagiozni karakter imaju i infekcije izazvane sa *Truperella pyogenes* (ređe se javljaju) i *Corynebacterium bovis*, ali i infekcije koagulaza negativnim vrstama iz roda *Staphylococcus* koje su manjeg značaja. Uzročnici poreklom iz životnog okruženja su brojne druge vrste bakterija roda *Streptococcus*, zatim *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Nocardia asteroides*, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Bacillus cereus* i neke druge vrste mikroorganizama kao što su gljivice (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*) i alge roda *Prototheca*. U literaturi je česta podela na “glavne i sporedne” izazivače mastitisa, pri čemu se pod glavnim podrazumevaju patogeni koji izazivaju mastitise teških kliničkih manifestacija i velike učestalosti tako da nanose velike direktne i indirektne štete na farmama krava. U glavne izazivače mastitisa spadaju: kontagiozni uzročnici *Staphylococcus aureus* i *S. agalactiae*, ali i uzročnici poreklom iz okruženja *S. uberis* i koliformne bakterije *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae* (Milanov i Stojanović, 2010; Alnakip i sar., 2014).

Postoji i drugi pristup problematici mastitisa koji se bazira na ispitivanju nasledne osnove krava, odnosno njihove prijemčivosti na mastitis. Postupak genetičke identifikacije krava povećane rezistencije/osetljivosti prema bolestima predstavlja polaznu osnovu za savremeni pristup selekciji na osnovu molekularnih markera. Zbog toga se nekoliko decenija radilo na identifikaciju genetičkih markera koji mogu biti korisni u programima selekcije i gajenja farmskih životinja (Dekkers i sar., 2004; Singh i sar., 2014). Poznato je da su monogenske osobine (genetički determinisane anomalije, bolesti, eksterijerne karakteristike) znatno jednostavnije za manipulaciju u odnosu na kompleksne fenomene koji su poligene prirode, pa samim tim i pod velikim uticajem brojnih faktora iz spoljašnje sredine. Naime, kada je u pitanju osobina koju izaziva tačno određena mutacija, te postoji takozvani direktni marker, lako je obaviti blagovremenu identifikaciju ne samo jedinki sa nepoželjnom osobinom, nego i heterozigotnih nosilaca mutacija, čime je omogućeno njihovo isključivanje iz odgajivačkog programa. Međutim, za mastitis, kao i za većinu ekonomski značajnih karakteristika, ne postoje direktni

markeri jer je reč o takozvanim kvantitativnim osobinama na koje utiče veliki broj gena, ali i mnogi drugi faktori, te je daleko teže uticati na njihovo poboljšanje, naročito metodama koje se koriste u konvencionalnoj selekciji (Dekkers i sar., 2004; Singh i sar., 2014). Na zdravstvene probleme (naročito mastitis), reprodukciju, ponašanje i brojne proizvodne (ekonomski značajne) karakteristike domaćih životinja, u velikoj meri utiču uslovi gajenja, tako da je nakon identifikacije gena koji utiču na njihovo ispoljavanje, neophodna kompleksna integrisana strategija njihove implementacije uz veliku dozu tzv. „opreznog optimizma“ (Dekkers, 2004). Ipak, trend korišćenja molekularnih markera u selekciji farmskih životinja već duže vreme se smatra nadmoćnim u odnosu na tradicionalne metode. Selekcija pomoću molekularnih markera (Marker Assisted Selection – MAS) podrazumeva identifikaciju gena ili genetskih markera i procenu njihove povezanosti sa proizvodnim osobinama u cilju njihove implementacije u uzgajivačke programe. „Kandidat-geni“ za mastitis su oni za koje postoje indikacije da utiču na pojavu mastitisa, te vredi dalje ispitivati oblike ispoljavanja tih gena (alele i polimorfizme) i njihovu povezanost sa mastitisom. Najviše su ispitivani geni koji su uključeni u proces imunog odgovora mlečne žlezde. Ogorevc i sar. (2009) navode da je do sada ispitano 934 kandidat gena koji imaju veze sa oboljenjem mlečne žlezde, odnosno sa razvojem mlečne žlezde, produkcijom mleka, osetljivošću i rezistencijom na mastitis. Navedeni autori ističu da 15 gena (BoLA-13, IL8RA, TLR4, C5AR1, CD14, IFNG, IL1B, IL6, IL8, LBP, SAA3, TLR2, TLR4, TNF, LTF,  $\beta$ -4 defensin) može da bude iskorišćeno u praćenju kako mehanizma nastanka same infekcije, tako i prirodne otpornosti krava na mastitis (Ogorevc i sar., 2009). Zbog uloge koju ima u laktogenezi, lučenju kolostruma i galaktopoezi, ispitivan je i gen za leptin i utvrđeno nekoliko polimorfizama tog gena i njihova povezanost sa prinosom i kvalitetom mleka mlečnih krava (Clempton i sar., 2011; Glantz i sar., 2012, Singh i sar., 2013; 2014). Mađutim, heritabilnost mastitisa (i kliničkog i supkliničkog) je relativno niska (De Haas i sar., 2002), te nije jednostavno zaključiti da li je moguća, odnosno opravdana selekcija kojoj je cilj dobijanje krava rezistentnih na mastitis. U novijoj literaturi se zaključuje da je malo podataka o genima koji su direktno ili indirektno povezani sa zdravljem mlečne žlezde, odnosno da tek treba

da se proceni veza između kandidat-gena (i potencijalnih genetskih markera) i zdravlja mlečne žlezde, kao i da se pri analizi moraju uzeti u obzir i podaci o svim patogenima koji su identifikovani u svakom od slučajeva mastitisa, zatim podaci o starosti krava, broj teljenja, uslovima smeštaja, higijeni i sistemu uzgoja (De Vliegher i sar., 2012). Drugim rečima, čak i da postoji genetička predispozicija za razvoj mastitisa, veliki broj drugih faktora utiče na pojavu bolesti. Zbog toga je generalni zaključak da su patogeneza i epidemiologija mastitisa junica u velikoj meri i dalje nepoznati i da je potrebno da se identifikuje što više faktora rizika koji su u stanju da ispolje patogeni uticaj na mlečnu žlezdu kako bi se poboljšali postojeći programi prevencije (De Vliegher i sar, 2012).

Zapaljenje mlečne žlezde ili mastitis krava, je oboljenje koje već jako dugo predstavlja jedan od najvećih problema u intenzivnoj proizvodnji mleka i dovodi do najvećih ekonomskih gubitaka u govedarstvu. Ekonomski gubici izazvani mastitisom (po grlu, odnosno slučaju bolesti) kreću se od 60€, u slučaju supkliničkog mastitisa, do 275€, u slučaju kliničkog mastitisa (Nielsen, 2009). Najveći gubici zabeleženi su u slučajevima kada se klinički mastitis razvio tokom rane laktacije i prilikom pojave supkliničkog mastitisa tokom kasne laktacije. Nažalost, opsežna istraživanja koje je sproveo Nielsen (2009) u vremenskom period 1987-2004 pokazala su da se najveći broj slučajeva kliničkog mastitisa razvija upravo tokom prve nedelje laktacije i dovodi do prosečnog gubitka od 578 l mleka (kod prvotelki), odnosno 782 l mleka (kod krava koje su se više puta telile) na godišnjem nivou. Supklinički mastitis u istom periodu izazvao je godišnji gubitak od 150 l (kod prvotelki) do 450 l mleka (kod krava koje su se više puta telile), a gubici u proizvodnji mleka imaju najveći udeo u ukupnim gubicima izazvanih mastitisom.

Mastitis je bolest multifaktorijalne prirode koja nastaje interakcijom muzne životinje, spoljašnje sredine (uključujući mašine za mužu) i mikroorganizama (Katić, 2010). Smatra se da tri faktora imaju osnovnu ulogu u nastanku mastitisa, a to su: nehigijensko držanje i ishrana, nepravilna eksploatacija, a posebno muža i infekcija kao neposredan uzrok pojave mastitisa. Kontrola prva dva faktora postiže se sprovođenjem osnovnih zoohigijenskih i zootehničkih uslova u zapatima muznih krava i podrazumeva svakodnevnu kontrolu vimena u cilju prevencije mastitisa

(svakodnevno obavezno pranje vimena pre muže i pravilnu ručnu ili mašinsku mužu, uz neizbežno potapanje sisa u dezinficijens posle muže). Kao preventivna mera se podrazumeva i terapija krava u zasušenju koja podrazumeva lokalnu aplikaciju antibiotika nakon poslednje muže. Antibiotička terapija u periodu zasušenju treba u narednoj laktaciji da obezbedi što duži period neinficiranosti vimena i smatra se najefikasnijom metodom za eliminaciju postojećih infekcija i redukovanje pojave novih intramamarnih infekcija (Royster i Wagner, 2015). Bolest se javlja u svim zaptima muznih krava, ali se učestalost pojavljivanja povećava u uslovima intenzivne proizvodnje mleka. Stoga se u zaptima muznih krava sa intenzivnom proizvodnjom mleka, primenjuju opšte i posebne mere za preventivu mastitisa (Katić, 2010). Opšte mere uključuju, pravilan izbor junica, higijenske uslove u objektima muznih krava, pravilnu ishranu prilagođenu stadijumu laktacije i proizvodnim karakteristikama muzne životinje. U početku su programi za suzbijanje imali za cilj da se redukuje pojava kontagioznih mastitisa, a poslednjih godina se uvode i mere za kontrolu mastitisa kako kontagioznih tako i mastitisa izazvanih mikroorganizmima iz okoline (Katić, 2010). Osnovu ovih programa čini, redukovanje trajanja infekcije u stadu, redukcija pojave novih infekcija i praćenje stope porasta infekcija. Redukovanje trajanja infekcija u stadu podrazumeva lečenje krava u laktaciji, terapiju krava u zasušenju i isključivanje krava sa čestim hroničnim mastitisima. Redukcija pojave novih infekcija se postiže higijenom vimena pre muže, održavanjem higijene muznih aparata između dve i posle muže, kao i higijenom vimena posle muže. Monitoring mastitisa i porast infekcije u zaptu se izvodi pregledom vimena, ispitivanjem mleka iz četvrti vimena krava primenom mastitis testa i bakteriološkim pregledom uzoraka mleka uzetih iz četvrti vimena krava (Katić, 2010). Zbog značaja mastitisa za zdravlje vimena krava i zdravlje ljudi kao i ekonomskih gubitaka u govedarskoj proizvodnji, u Zakonu o veterinarstvu (Sl. glasnik RS 91/05, 30/10) je u delu zaraznih bolesti životinja određenih Zoosanitarnim kodeksom (OIE) uvrstio oboljenje - Enzooski mastitis goveda. U Programu mera zdravstvene zaštite životinja u Republici Srbiji (Sl. glasnik RS 21/12) izrađenog na osnovu navedenog Zakona je propisano da veterinarska služba Republike Srbije mora da prati, otkriva, suzbija i kontroliše infektivno zapaljenje mlečne žlezde, izazvano stafilokokama ili streptokokama (Vakanjac, 2015). Treći

faktor, infekcije, kontroliše se antibioticima, koji se primenjuju sa ciljem uništavanja patogenih mikroorganizama, ali tako da pri tome ne dođe do oštećenja tkiva mlečne žlezde. Terapija supkliničkih mastitisa nije indikovana osim u slučajevima kada su uzročnici mastitisa *Staphylococcus aureus* ili *Streptococcus agalactie*. Tada se terapija primenjuje odmah nakon postavljene dijagnoze i ne čeka se momenat zasušanja (Royster i Wagner, 2015).

Međutim, ni jedan od brojnih načina lečenja mastitisa primenjivan tokom prethodnih decenija nije u potpunosti dao odgovarajuće rešenje, tako da je problem mastitisa i dalje prisutan i veoma aktuelan. Uspeh terapije mastitisa zavisi od velikog broja faktora: pravilne dijagnoze, odabira leka i načina aplikacije, imunoloških mehanizama u mlečnoj žlezdi kao i patogenosti mikroorganizma. Zbog svega navedenog, mastitis i dalje predstavlja veliki ekonomski problem pa se rešenja traže u imunoprofilaksi kao i u alternativnim metodama lečenja kao što su homeopatija, biljni intramamarni preparati, terapija ozonom i laserskim zracima (Alnakip i sar., 2014; Vakanjac, 2015).

Mastitise nije moguće iskoreniti, ali ih je moguće kontrolisati. Poznavanje uzročnika infekcije osnova je za odabir terapije i preduzimanje profilaktičkih mera. Prikupljanje informacija o učestalosti pojave mastitisa izazvanih određenim vrstama mikroorganizama, omogućava praćenje i razumevanje najčešćih problema jednog stada (Milanov i Stojanović, 2010).

## **2.5. Mehanizmi odbrane mlečne žlezde od infekcija i značaj određivanja broja somatskih ćelija u mleku**

Mlečna žlezda poseduje prirodne mehanizme odbrane od infekcija. Prirodni odbrambeni sistem mlečne žlezde bazira se na četiri mehanizma: 1) fizička zaštita, koju čini intaktna koža vimena; 2) fizičko-hemijska zaštita, koju čini keratin sa svojim baktericidnim dejstvom; 3) nespecifični imunološki odgovor sa aktivacijom zapaljenske reakcije i 4) specifični imunološki odgovor koji uključuje aktivaciju imunocita. Nespecifični faktori, odnosno prirodne fizičke barijere i faktori rezistencije, odnosno imuni odgovor čitavog organizma, čine takozvanu "prvu liniju odbrane mlečne žlezde" od patogenih mikroorganizama.

Ukoliko mikroorganizmi prođu ovu liniju odbrane i prodru u cisternu mlečne žlezde, sreću se sa "drugom linijom" odbrane mlečne žlezde, koju čine somatske ćelije u mleku, laktenini, odnosno komplement lizozim, laktoferin i laktoperoksidaza, ali i imunoglobulini koji su odgovorni za specifičan imunološki odgovor (Nickerson 1985, Alnakip i sar., 2014).

Zdrava i neoštećena koža vimena, a posebno na papilama, izuzetno je značajna jer minimizira rizik od bakterijske infekcije vimena. Sisni kanal je iznutra obložen višeslojnim epitelom (*stratum granulosum*, *stratum corneum*) koji je relativno deblji u odnosu na ostale delove kože goveda. *Stratum corneum* odgovara sloju keratina koji zatvara lumen kanala između dve muže. Keratin ima zaštitnu ulogu tako što predstavlja mehaničku barijeru u sisnom kanalu, posebno tokom kasnih faza u periodu zasušenja. Osim toga zaštitna uloga keratina je da se za njega lepe bakterije koje se deskskvamacijom orožalih epitelnih ćelija sisnog kanala izbacuju u spoljnu sredinu (Alnakip i sar., 2014). Keratin u sisnom kanalu bogat je esterifikovanim i neesterifikovanim masnim kiselinama, a posebno palmito-oleinskom i linoleinskom kiselinom, koje imaju snažan antimikrobni efekat. Genetski uticaj na sadržaj masnih kiselina u keratinu je visok i može se koristiti za selekciju krava otpornih na mastitis. *Stratum corneum* zdrave kože vimena je barijera za prodor vode sa površine prema unutra, kao i za gubitak tečnosti iz tkiva. Orožali epitel puca ako procenat vode i njemu opadne ispod 10% i tada može da dođe do gubljenja zaštitnih kiselih materija kože, odnosno mlečne kiseline, slobodnih masnih kiselina i aminokiselina (Raab, 1990). Ove promene u epitelu kože pogoduju razmnožavanju patogenih bakterija na papilama, a time i mogućnost nastanka intramamarne infekcije (Pankey i sar., 1984; Alnakip i sar., 2014). Mleko sadrži određne faktore koji učestvuju u odbrani, mlečne žlezde od infekcija i to komplement, lizozim, laktoferin i laktoperoksidazu (Tizard, 1996). Komplement je sistem koji se sastoji od proteinskih komponenti (C1-C9) i zajedno sa antitelima predstavlja element humoralnog imunološkog sistema, a u mleku ga ima u veoma maloj količini (Rainard i sar., 1995). Aktivisanje komponenti komplementa pobuđuje mastocite da izlučuju biološki histamine, a hemotaksičnim uticajem privlače fagocite i omogućavaju opsonizaciju. Jedan od stalnih sastojaka mleka je lizozim. Svoje baktericidno dejstvo lizozim ispoljava

tako što cepa veze u kompleksu mukoproteina ćelijskog zida bakterija (Tizard, 1996). Koncentracija lizozima u mleku je niska (0,13 mg/100ml) ali se ona povećava za vreme infekcije. Laktoferin je glikoprotein mleka koji konkuriše bakterijama vezujući za sebe gvožđe, i tako ga čini nedostupnim za bakterije, a sintetišu ga neutrofilni granulociti, makrofagi i epitelne ćelije vimena (Harmon, 1980). Količina laktoferina u mleku krava varira od 0,02-0,035 mg/ml, u zavisnosti od vremena laktacije. Pored bakteriostatskog dejstva, laktoferin ima sposobnost da zaštiti parenhim mlečne žlezde od štetnog delovanja slobodnih radikala kiseonika (Legrand, 2004; Lee 2004). U mleku se pored laktoferina nalazi i transferin, protein koji takođe za sebe vezuje gvožđe. Koncentracija transferina u mleku krava je veoma niska (1mg/ml u kolostrumu, 0,02-0,04 mg/ml u mleku, 4-5 mg/ml u krvnom serumu) (Sanchez, 1988) a u toku mastitisa, njegova koncentracija u mleku se povećava posebno kod mastitisa izazvanog sa gram negativnim bakterijama (Reinard, 1983). Enzim ksantin oksidaza iz opne micela mlečne masti, katalizuje stvaranje azot oksida od neorganskog nitrita, koji u aerobnim uslovima dovodi do nastanka peroksinitrita sa snažnim baktetricidnim dejstvom. Mleko krava, koje ima visoku aktivnost ksantin oksidaze, deluje bakteriostatski na *E. coli*, nakon dodavanje nitrita (Hancock, 2002). Citokini su supstance proteinske prirode koje imaju ulogu sličnu hormonima, regulišu lokalnu zapaljensku reakciju, a putem cirkulacije mogu dospeti do udaljenih organa i izazvati sistemsku reakciju (Burvenich i sar., 2000). Nosioци humoralne imunološke reakcije su B-limfociti. Imunološki zreli B-limfociti sintetišu se u hematopoeznim ogranima, poseduju receptore koji su po prirodi imunoglobulini, i oni se nalaze u membrani. Najpre se pojavljuju B-limfociti sa receptorima koji nose IgM, zatim IgG i na kraju sa IgA receptorima (Mihajlović, 1983). T-limfociti, nosioци ćelijske imunološke reakcije, sazrevaju u timusu. Većina imunoglobulina mleka potiče iz seruma, dok se sekretorni IgA i IgM sintetišu u samoj mlečnoj žlezdi i prelaze u mleko zajedno sa IgG antitelima. Imunoglobulini klase G sintetišu se u organizmu pri kraju imunološkog odgovora, a maksimalna sinteza se odigrava u toku sekundarne imunološke reakcije. Molekuli IgG imaju sposobnost neutralizacije bakterijskih toksina, virusa, učestvuju u fagocitozi, aktivišu komplement i nastaje citoliza. Potklasa IgG<sub>1</sub> kod goveda, ovaca i koza

aktivnije komplement i prelazi iz krvi u kolostrum, što nije slučaj sa podklasom IgG<sub>2</sub>. Imunoglobulini M uspešno vezuju komplement, pa stoga dosta efikasno izazivaju citolizu. Imunoglobulini klase M se sintetišu u toku primarnog imunološkog odgovora i poluživot im je kratak. Sintetisani IgM u epitelnim ćelijama mukoze vezuju se za protein-sekretornu komponentu i putem fagocitoze se izbacuju na površinu sluzokože, gde zajedno sa IgA štite sluzokožu od prodora i delovanja patogenih mikroorganizama. Imunoglobulini klase A nemaju mogućnost aktivacije komplementa klasičnim putem, ali je utvrđeno da u zajednici sa lizozimom, preko C3 komponente, mogu da aktiviraju komplement (Stojić, 1999).

### **2.5.1. Uticaj alge iz roda *Prototheca* na broj somatskih ćelija u mleka**

U mleku krava, u fiziološkim uslovima, nalaze se različiti tipovi ćelija: neutrofilni granulociti (polimorfonuklearni granulociti, PMNL), limfociti, eozinofili, makrofagi i epitelne ćelije (Pillai, 2001). Ovaj ćelijski sadržaj je poznat pod nazivom "**broj somatskih ćelija**" (*somatic cell count - SCC*). U mleku krava iz zdravih četvrti vimena najbrojnije ćelije su makrofagi i njihov procenat se može kretati između 30-74% od ukupnih ćelija u mleku zdravog vimena (Burvenich 2000). Rizik od pojave kliničkih mastitisa je veći u zapaćima krava sa povećanim brojem somatskih ćelija Wilton (1972). Nasuprot tome, sve više postaje jasno da je veoma nizak broj SCC praćen povećanim rizikom od kliničkog mastitisa (Harmon, 1994). Broj somatskih ćelija može da predstavlja pokazatelj supkliničkih mastitisa i kao takav može da posluži u programu selekcije. Uzgoj grla sa nižim brojem SCC treba da rezultira smanjenjem broja kliničkih mastitisa, jer su SCC i klinički mastitisi u pozitivnoj korelaciji (Mrode, 1996). Broj SCC u mleku zdravih krava kreće se od 160-450 x 10<sup>3</sup>/ml, a prema kriterijumima međunarodne mlekarske federacije, granična vrednost broja ćelija u 1 ml mleka zdravih krava iznosi 500 x 10<sup>3</sup>/ml (Schalm, 1971; Mc Donald 1981). Na početku laktacije, broj somatskih ćelija može da se kreće i do 2.500.000 ćelija u ml (Frerking, 1961). Diferencijalna bela krvna slika u mleku zdravih četvrti pokazuje najveći procenat polimorfonukleara (23,±9,8%), zatim makrofaga (10,1±7,4%), i



limfocita ( $23,9 \pm 17,4\%$ ) od čega je procenat pomagačkih T limfocita (Th limfociti  $CD4^+$ )  $5 \pm 4,2\%$  i citotoksičnih T limfocita (Tc limfociti,  $CD8^+$ )  $11,7 \pm 6,8$  (Chaffer 2000). U mleku zdravih krava dominiraju makrofagi, dok su u toku infekcije neutrofili predominantni ćelijski tip (Pillai, 2001). U uzorcima mleka uzetim neposredno pre muže procenat polimorfonukleara je sličan kao u uzorku ukupnog mleka (40-50%), dok u uzorku uzetom posle muže procenat opada na svega 8% (O' Brien, 1999). Broj ćelija u mleku široko varira i zavisi od faze laktacije. Kako laktacija odmiče, povećava se broj somatskih ćelija u mleku i udeo neutrofila, a pre zasušenja može da dostigne i 40% (Concha, 1986). Prestankom izmuzanja, tkivo mlečne žlezde podleže intenzivnim fiziološkim promenama. U početku zasušenja, naročito u prvih sedam dana, dolazi do porasta broja somatskih ćelija i do oko  $2-5 \times 10^6/ml$ , a posle toga opada i zadržava se na  $1-3 \times 10^6/ml$  (Mc Donald i Anderson, 1981). U toku procesa involucije broj somatskih ćelija se povećava i do 1.000.000 ćelija/ml, verovatno kao posledica prestanka muže, da bi se pred sam partus broj ćelija ponovo smanjio na normalne vrednosti (Schalm, 1971, Nickerson, 1985). Početno povećanje broja somatskih ćelija u periodu zasušenja je verovatno posledica prestanka izmuzanja mleka kao i resorpcije komponenti mleka. Ukupan broj ćelija ostaje na visokom nivo kroz najveći period zasušenja. U toku zasušenja, najčešći tip ćelija u mleku su makrofagi, dok kolostrum pokazuje porast polimorfonuklearnih leukocita (PMNL), kao i kod svih infekcija mlečne žlezde. U sekretu neinficirane mlečne žlezde tokom zasušenja je povećan broj makrofaga (48%) i limfocita (30%), dok je broj polimorfonukleara smanjen (22%). Broj B limfocita se povećava u sekretu mlečne žlezde u zasušenju (28%), a posebno je visok u kolostrumu (40%) što objašnjava povećanu koncentraciju IgA u kolostrumu (Nickerson, 1985). Aktivnost leukocita kako iz krvi tako i iz mleka je snižena nedeljama pre porođaja, a posebno u vreme telenja, a vraća se na fiziološki nivo 1-3 nedelje posle partusa. Smanjena baktericidna aktivnost leukocita iz krvi značajno smanjuje njihovu sposobnost za eliminisanje mikroorganizama iz mlečne žlezde (Saad, 1989). U većini uzoraka mleka mogu se naći ćelije sekretornog epitela vimena (Lee, 1980). U mleku se mogu naći najčešće tri različite kategorije ćelija. Polimorfonuklearni leukociti - neutrofilni granulociti su najčešće ćelije koje se mogu naći u mleku, sa jedrima od 2 do 5

segmenata. Veličina im varira od 9 do 15  $\mu\text{m}$ . Mleko najviše sadrži neutrofilnih granulocita, a zatim eozinofilnih i najmanje bazofilnih granulocita (Marković, 1982). Monociti bez lipidnih inkluzija se karakterišu promenljivim i nejasnim oblikom nukleusa sa difuznim hromatinom. Citoplazma ovih ćelija može biti i nekoliko puta veća od jedra, a veličina im se kreće od 8 do 18  $\mu\text{m}$ . Monocita sa lipidnim inkluzijama ima dve vrste. Jedna vrsta ćelija su tipične masne ćelije mleka sa karakterističnom membranom oko fagocitnih vakuola. Druga vrsta ćelija je slična prvoj, samo bez karakteristične membrane i manje je prisutna u mleku od prve vrste ćelija. Limfociti su karakteristični po krupnom jedru i sa veoma malo prisutne citoplazme. Epitelne ćelije potiču iz alveola, mlečnih kanala, cisterne i izvodnog kanala mlečne žlezde. Veoma često se mogu naći tesno priljubljene jedna uz drugu ili u skupini. Promene u sastavu i količini mleka su jasno izražene pri broju ćelija većem od 500.000/ml. Povećan broj SCC je povezan sa smanjenjem proizvodnje mleka i promenama koje mogu dovesti do produženja vremena podsiravanja, zadržavanje veće količine vode u siru, inhibiranja rasta starter kultura, itd (Auldust i Hubble 1998). Povećan broj SCC je takođe povezan i sa smanjenjem koncentracije laktoze, dok pojedini autori navode da dolazi do neznatnih promena u koncentraciji masti u odnosu na mleko sa dozvoljenim brojem SCC (Korhonen i Kaartinen, 1995).

## **2.6. Preventiva mastitisa izazvanih *Prototheca* spp.**

Epidemiologija i patogeneza mastitisa krava izazvanih *Prototheca* spp. je značajna za svaremeni način držanja mlečnih krava i preventivu mastitisa. *Prototheca* spp. je mikroorganizam iz okruženja, pa nastanak mastitisa, izazvanog ovim algama, zavisi od mnogobrojnih predisponirajućih faktora, kao što su uslovi smeštaja, vlažnost u objektima, prisustvo organskih materija, nedovoljna higijena muže (Malinowski i sar. 2002). Infekcija se prenosi direktno sa krave na kravu tokom procesa muže, aparatima za mužu i rukama mužača (Di Persio i sar. 2001., Janosi i sar. 2001). Povećani rizik od nastanka mastitisa izazvanih prototekama imaju krave koje su obolele od akutnog mastitisa

izazvanog bakterijama i koje su neuspešno lečene antibioticima (Janosi i sar. 2001). *Prototheca* spp. može biti široko rasprostranjena u okruženju farme muznih krava i visoko su rezistentne na većinu antimikrobnih preparata, pa u cilju smanjenja incidencije prototekoze pažnju treba usmeriti ka poboljšanju preventivnih mera na nivou stada, edukaciji kliničara na prisustvo patogena i upotreba različitih metoda u postavljenju dijagnoze ovog mastitisa (Costa i sar., 1998). Veoma je važno da se spreči kontaminacija vrha papila kao i da se poveća otpornost krava na ove uzročnike. Smanjenje izloženosti papila prototekama zahteva visok stepen higijene, posebno u periodima zasušenja i neposredno posle telenja, u porodilištima, kao i u izmuzištima. Eliminacija vlage, pogotovo u prostirci, može da bude jedan od najproduktivnijih načina smanjenja broja algi u okruženju, a sam tim i učestalosti mastitisa (Janosi i sar., 2001., Lopes i sar., 2008).

Neadekvatni uslovi smeštaja u objektima mogu doprineti povećanoj incidenci mastitisa sa mikroorganizmima iz okruženja (Smith i Hogan, 1993). Smeštajni objekti moraju biti tako napravljeni da omoguće maksimalan komfor i minimalan stres i fizičke poverede krava tokom cele godine. Nedostatak adekvatne ventilacije je obično uzrok pojave povećanog procenta vlage u starim objektima. U takvim objektima sa povećanim procentom pojave mastitisa, od velikog značaja je čišćenje objekata korišćenjem vrele vode pod visokim pritiskom ili prskanje algacidima (Baumgarner, 1997). Krave na paši imaju u većini slučajeva smanjeni rizik od nastanka mastitisa izazvanih mikroorganizmima iz okruženja, međutim u plavnim i vlažnim područjima može doći do visoke izloženosti vimena krava mikroorganizmima iz okruženja (Harmon, 1992). Neadekvatni higijenski uslovi, za vreme i posle muže, mogu doprineti nastanku mastitisa. Održavanje higijene papila (suve i čiste) kao i higijene i ispravnosti aparata za mužu mogu da smanje incidenciju mastitisa. Dodatno, davanjem sveže hrane životinjama neposredno nakon muže sprečava ih da legnu, što omogućava da se sisni kanal zatvori (Costa i sar., 1998).

Krave sa mastitisom izazvanim prototekama imaju važnu ulogu kao kliconoše odnosno održavaju uzročnika u stadu i spoljašnjoj sredini (Lopes i sar., 2008). Prototeke mogu dugo da perzistiraju u mlečnoj žlezdi, čak i u periodima

zasušenja, zbog smanjene efikasnosti odbrambenih mehanizama mlečne žlezde prema algama (Moller i sar., 2007). Shodno tome, ukoliko postoje istorijski podaci o pojavi mastitisa izazvanih algama, potrebno je ispitivanje uzoraka mleka iz pojedinih četvrti vimena krava pred ulazak u zasušenje, a inficirane jedinke treba ukoniti iz stada. Rana dijagnoza i odvajanje inficiranih krava, odvajanje smeštajnog prostora od izmuzišta, kontrola mleka novo uvedenih jedinki u stado, se smatraju efikasnim merama u suzbijanju mastitisa izazvanih prototekama (da Costa i sar., 2004; Bueno i sar., 2006).

U više studija je ispitivano delovanje preparata sa algicidnim delovanjem na *P. zopfii*. Melville i saradnici (2002) su ispitivali *in vitro* osetljivost *P. zopfii* na 0,1% bakar sulfat (algicidni efekat), 0,3% srebro nitrat (sredstvo za kauterizaciju) i 0,01% hlorheksidin (antiseptično sredstvo). Autori su utvrdili da srebro nitrat dovodi do zadebljanja ćeliskog zida algi, hlorheksidin dovodi do degradacije intracelularnih organela, a bakar sulfat dovodi do promene u unutrašnjem sloju ćelijskog zida. Salerno i saradnici (2010) su ustanovili da niske koncentracije natrijum hipohlorita (0,039%-0,156%) i joda (0,156%-0,625%) efikasno inhibiraju rast *P. zopfii*. Budući da je jod bio najefikasniji u inhibiranju rasta *P. zopfii* autori smatraju da se jod može koristiti u preventivi mastitsa kao i kod kauterizacije papila vimena u cilju sprečavanja širenja dalje infekcije *P. zopfii*. Ispitivanjem efikasnosti različitih koncentracija joda, četverovalentnih jedinjenja amonijaka i dodecilbenzensulfonske kiseline prema izolatima *P. zopfii* Lassa i saradnici (2011) su utvrdili da su ispitivani dezinficijensi efikasni u koncentracijama od 1: 1000, 1:100 i 1,10 pojedinačno. Lopess i saradnici (2008) su dokazali efikasnost komercijalnih dezinfekcionih sredstava Biocitro® (askorbinska kiselina, flavonoidi i druge organske kiseline) i Eco plus® (hloriran natrijumov rastvor) prema *P. zopfii*, dok su Combicid® (kiselina za uklanjanje kamenca) i Prodip G® (hlorheksidin diglukonat) inhibirali rast samo određenih sojeva prototeka. Ispitivana su i toksična dejstva indol-3-sirćetne kiseline kombinovanih sa peroksidazom rena koji su inhibirali rast i formiranje kolonija *P. zopfii* (Cunha i sar. 2010). Ispitivana je i potvrđena algicidna aktivnost prirodnih esencijalnih ulja, bergamota i čajevca, prema *P. zopfii in vitro* (Tortorano i sar. 2008). Ispitivani su ekstrakti biljaka od kojih je ekstrakt *Camellia sinensis*

pokazala inhibitornu aktivnost prema gljivicama i *P. wickerhamii*, sa minimalnom inhibitornom koncentracijom od 300µg/mL za alge (Tutchetti i sar. 2005). Ispitivanjem antimikrobne aktivnost goveđeg lakotoferinana prema nekoliko mikroorganizama, uključujući i *P. zopfii*, utvrđeno je da su izolati prototeke izuzetno osetljivi na 1mg/mL (Kawai i sar. 2007) i 7mg/mL (Lee i sar. 2004) goveđeg lakotoferina. *Prototheca* spp. pokazuje različitu osetljivost na temperature pasterizacije 62-65°C u trajanju od 30 min, 72-75 °C u trajanju 15 minuta i 72-75 °C tokom 20 sekundi (Lassa i sar. 2011.; Marques i sar. 2010b). Temperatura pri kojoj se efikasno inaktiviraju *P. zopfii* i *P. blaschkeae* jeste temperatura od 100°C u trajanju od 1 sekunde (Marques i sar. 2010b).

### 3. CILJ I ZADACI RADA

#### **Cilj istraživanja**

Cilj ovih istraživanja je da se ispita raširenost mastitisa izazvanih sa *Prototheca zopfii* i izvrši genotipizacija *P. zopfii* izolovanih u slučajevima mastitisa.

#### **Zadaci istraživanja**

S obzirom na cilj istraživanja, postavljeni su sledeći zadaci:

- na osnovu anamneze o neefikasnoj dugotrajnoj antibiotskoj terapiji i povećanom broju somatskih ćelija u mleku izvršiti odabir krava od kojih će se uzimati uzorci mleka za analize;
- uzorkovanje mleka ispitivanih krava sa različitih lokacija u Vojvodini i centralnoj Srbiji;
- mikrobiološko ispitivanje uzoraka mleka i određivanje broja somatskih ćelija u uzorcima mleka;
- identifikacija izolata *Prototheca* spp. pripremom PCR tehnike i genotipizacija izolata;
- ispitivanje osetljivosti izolovanih sojeva *Prototheca* spp. na antibiotike i antimikotike disk difuzionom metodom;
- statistička analiza dobijenih rezultata.

## **4. MATERIJAL I METODE RADA**

### **4.1. Materijal**

#### **Ogledne životinje**

Ogled je obuhvatao 494 mlečne krava holštajn-frizijske rase (HF) na pet farmi izabranih na osnovu pozitivnog CMT testa (California mastitis test) u mleku na farmama u Vojvodini i centralnoj Srbiji. Ogled je izveden u periodu od septembra 2015. do februara 2016. Sve krave su držane u sličnim zoohigijenskim i zotehničkim uslovima slobodnog i vezanog sistema gajenja. Takođe, sve krave su dobijale približno sličan obrok u zavisnosti od proizvodne kategorije. Mužene su mašinski dva puta dnevno.

### **4.2. Metode rada**

#### **4.2.1. Uzimanje uzoraka mleka, vode za napajanje, briseva poda, opreme i napajalica**

Iz pojedinih četvrti vimena krava, kod kojih je CMT utvrđen u mleku povećan broj somatskih ćelija, uzeti su uzorci mleka za mikrobiološko ispitivanje i direktno mikroskopsko određivanje broja somatskih ćelija. Uzorci mleka su uzeti u sterilne epruvete, u količini od 5 do 10 mL, pod aseptičnim uslovima. Pre uzimanja uzoraka, vime je obrisano krpom, dobro natopljenom i iscedenom u dezinficijesu. Čišćenje i dezinfekcija vrhova papila i otvora sisnog kanala vršena je tako da je palcem i savijenim kažiprstom leve ruke prihvatana papila blizu vrha, stezana i povlačena da bi isteklo nekoliko kapi mleka u tankom mlazu, a zatim je vrh papile brisan sa tamponom vate, natopljenim 70% etanolom. Dezinfekcija je vršena metodom "ka sebi" dok je uzimanje uzorka vršeno metodom "od sebe". Epruvete su postavljene gotovo u horizontalni položaj i iz svake četvrti izmuzano je nekoliko mililitara mleka. Uzorci mleka su u ručnom frižideru dopremani u laboratoriju.

Uzorci vode za napajanje životinja (30) uzimani su pod aseptičnim uslovima u sterilne posude u količini oko 0,5 litara.

Sa podova, opreme i pojilaca uzimani su brisevi, koji su odmah po uzimanju preneti u transportnu podlogu i u ručnom frižideru dopremani u laboratoriju

#### **4.2.2. Određivanje broja somatskih ćelija u mleku**

##### **Pravljenje mikroskopskog preparata**

Broj somatskih ćelija ispitivan je svetlosnom mikroskopijom. Od svih uzoraka mleka pripremljeni su preparati. Na mikroskopsku pločicu preneto je 0,01 mL mleka i razliveno na površinu od 1 cm<sup>2</sup>. Da bi se ovo postiglo korišćeni su odgovarajući kartoni ispod mikroskopske pločice, sa ucrtanim kvadratom veličine 1 cm<sup>2</sup>. Nakon sušenja (najmanje 24h) preparati su obezmašćeni 5 minuta u ksilolu, zatim osušeni na vazduhu i fiksirani 5 minuta u etanolu, i nakon sušenja na vazduhu obojeni bojom za somatske ćelije.

##### **Priprema boje za somatske ćelije**

- 375 mL etil alkohola, 130 mL destilovane vode i 3 g metilenskog plavog je kuvano dok se boja potpuno nije rastvorila, a zatim je boja filtrirana kroz filter papir. U rastvor su zatim dodata dva rastvora (A i B):

- Priprema rastvora A: 10 g bazičnog fuksina je rastvoreno u 100 mL etilalkohola i pre upotrebe je filtriran kroz filter papir;

- Priprema rastvora B: 10 mL anilina.

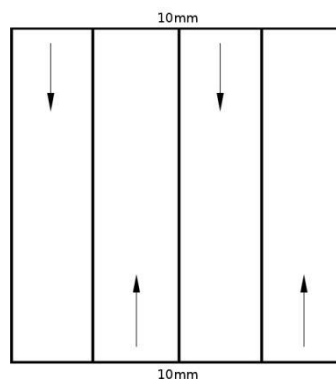
Svi rastvori su pomešani, blago zagrejani, a zatim je dodato 25 mL 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i 300 mL vrele destilovane vode, rastvor je ponovo zagrejan 1 minut i zatim profiltrovan.

##### **Brojanje somatskih ćelija**

Pomoću mikroskopa brojane su ćelije na preparatu, samo u poljima koja su ispunjena mlekom. Brojane su samo ćelije sa jedrom. Uobičajena veličina ćelija je 8µm ili veće. Nisu brojane ćelije koje su manje od 4µm. Nisu brojane potpuno raspadnute ćelije, kojima je jedro potpuno dezintegrisano. Ovakvi fragmenti su uzeti u obzir samo ako je više od 50% jedarnog materijala vidljivo. Ćelijske nakupine ili slepljene ćelije su brojane kao jedna ćelija, izuzev ako jedarne jedinice nisu jasno izdvojene.



Prilikom brojanja, na preparatu se pošlo od gornjeg levog ugla, zanemarene su odnosno preskočene ivice preparata od barem jednog vidnog polja, a zatim su brojani ćelijski elementi čitavom dužinom preparata, do krajnje donje ivice. Zabeležene su izbrojane vrednosti ćelija duž vertikale, zatim je postupak ponavljen još tri puta, odnosno dok nije dobijen zbir sa 4 segmenta (tj. 4 vertikale preparata-  $N_b$ ) (slika 1). Širina segmenta jednaka je prečniku vidnog polja ( $D_f$ ) a dužina jednaka dužini preparata ( $W_f$ ). Kada je određen broj somatskih ćelija duž četiri vertikale, dobijene vrednosti su sabirane i to je predstavljalo  $N_t$  vrednost.



Slika 1. Princip brojanja somatskih ćelija na preparatu (preuzeto A. Kos, specijalistički rad, 2012)

Izračuna se srednja vrednost broja somatskih ćelija u jednom segmentu ( $N_t/N_b$ ). Srednja vrednost broja somatskih ćelija po jednom segmentu pomnoži se sa Radnim faktorom. Radni faktor se izračunava po sledećoj formuli:

$$RF = W_s/D_f \times V_m$$

gde je:

$W_s$  - širina preparata (10mm)

$D_f$  - prečnik vidnog polja mikroskopa

$V_m$  - zapremina mleka upotrebljena za pravljenje preparata

Prema ovom obrascu, broj somatskih ćelija se određuje po sledećoj formuli:

$$N = RF \times (N_t/N_b)$$

Ili:

$$N = W_s \times N_t / D_f \times N_b \times V_m$$

gde je:

$W_s$  - širina preparata (10 mm)

$N_t$  – ukupan broj izbrojanih somatskih ćelija

$D_f$  - prečnik vidnog polja mikroskopa

$V_m$  – zapremina uzorka (0,01 mL)



Slika 2. Preparat sa malim brojem somatskih ćelija (uvećanje 1000x),



Slika 3. Preparat sa velikim brojem somatskih ćelija (uvećanje 1000x)

#### **4.2.3. Izolacija *P. zopfii* na Sabouraud dekstroznom agaru**

Svi uzorci mleka i vode koji su u ručnom frižideru dopremani u laboratoriju zaejavani su u količini od 0,1 mL na Sabouraud dekstrozni agar (Torlak, Srbija) krvni agar sa dodatkom 8% ovčije krvi (Torlak, Srbija) i

MacConkey agar i inkubirani u termostatu na 37°C 24-48h u aerobnim uslovima. Na iste podloge zasejani su uzorci briseva podova, opreme i pojilica. Nakon inkubacije ploče su makroskopski i mikroskopski pregledane na specifičan izgled i rast kolonija.

#### **4.2.4. Identifikacija *P. zopfii* PCR metodom**

##### **4.2.4.1. Ekstrakcija DNK alge *P. zopfii* i procena količine ekstrahovane DNK**

Ekstrakcija DNK alge *P. zopfii* poreklom iz mleka vršena je podvrgavanjem visokim i niskim temperaturama kolonija izraslih na hranljivim podloge.

##### **4.2.4.2. Ekstrakcija DNK alge *P. zopfii* iz kolonija**

Od kolonija koje su morfološki odgovarale izgledu *P.zopfii*, vrhom eze ili nastavkom za pipete uzimana je mala količina kolonije koja je resuspendovana u 30 µl sterilne vode u 1.5mL pvc epruветama. Dobijeni sadržaj je podvrgnut sledećem temperaturnom režimu u 3 ciklusa naizmenicno: 1 min zamrzavanje u tečnom azotu pa 2 min kuvanja u termobloku na temperaturi od 98 °C. Nakon navedenih postupaka, dobijeni sadržaj se koristio kao DNK templat.

Izolati nukleinske kiseline su čuvani na -20°C do amplifikacije primenom PCR tehnike. U cilju kontrole efikasnosti procesa izolacije, uporedo sa izolacijom ispitivanog materijala, obavljena je izolacija sigurno pozitivnog materijala (potvrđeno sekvenciranjem) i redestilovane vode (ddH<sub>2</sub>O). Izolati su skladišteni u hladnjak na -20°C dok se ne pristupi amplifikaciji putem PCR metode.

DNK ekstrakti su kvantifikovani korišćenjem spektrofotometra „Nanodrop“ (Germany). Dobijena količina DNK nakon ekstrakcije koristeći komercijalni set je

iznosila u proseku 30 ng/uL, dok dobijena količina DNK ekstrakcijom iz izraslih kolonija je iznosila od 80 ng/uL do 180 ng/uL.

#### 4.2.4.3. Amplifikacija DNK *P. zopfii* koristeći duplex-PCR metodu

U svrhu utvrđivanja prisustva i determinacije DNK *P. zopfii* korišćena je duplex-PCR metoda koju su inicijalno uspostavili Gao i sar. (2011) koja omogućava istovremeno umnožavanje genotip-specifičnih delova genoma (18S rDNK gena) *P. zopfii* genotip 2 i delova genoma zajedničkih sa sve alge koje pripadaju vrsti *P. zopfii*. Za potrebe umnožavanja delova genoma i determinacije vrste *P. zopfii* (genotip 1,2,3) uzročnika, korišćeni su genotip-specifični prajmeri opisani u Roesler i sar. (2006): Proto18-4f, PZGT 1/r, PZGT 2/r, PZGT 3-IK/f, PZGT 3/r i Onozaki i sar. (2009): 18 PZF1, 18 PZR1 (Tabela 3).

Tabela 3. Prajmeri korišćeni u svrhu molekularne identifikacije genotipa iz vrste *P. zopfii*

Prajmer	Sekvenca (5'-3')	<i>P. zopfii</i> genotip	Ciljani gen	Očekivana veličina produkta (bp)
18 PZF1	ACAATACGTAGCGATGCCGAAC		18S rDNK	233
18 PZR1	GCCAGCCAGAGGACGCCGAA		18S rDNK	
Proto18-4f	GACATGGCGAGGATTGACAGA	Genotip 1, 2	18S rDNK	
PZGT 1/r	GCCAAGGCCCCCGAAG	Genotip 1	18S rDNK	150
PZGT 2/r	GTCGGCGGGGCAAAGC	Genotip 2	18S rDNK	165
PZGT 3-IK/f	CAGGGTTCGATTCCGGAGAG	Genotip 3	18S rDNK	126
PZGT 3/r	GTTGGCCCGGCATCGCT	Genotip 3	18S rDNK	

Temperaturni režim i PCR protokol za duplex PCR preuzet je iz rada Gao i sar. (2011). PCR amplifikacija obavljena je u aparatima Mastercycler Personal (Eppendorf) i MultiGene Gradient (Labnet International Inc.) u zapremini od 25 µl koja je sadržala 1× PCR-bufer A (Kapa Biosystems), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Kapa Biosystems), 0,2 mM od svakog deoksinukleozid trifosfata (Qiagen), 0,5 µM od svakog prajmera, 0.5 U *Taq* polimeraze (Kapa Biosystems) i 2 µl DNK uzorka. Za

svaki PCR, korišćena je pozitivna kontrola, DNK *P. zopfii* pozitivnog uzorka (izolovana iz podloga u kojima su i mikroskopski detektovane alge) i negativna kontrola (ddH<sub>2</sub>O) paralelno sa uzorcima koje ispitujemo, a PCR parametri su prikazani Tabeli 4.

Tabela 4. Protokol za dupleks PCR reakciju amplifikacije delova genoma *P. zopfii*

1 ciklus		38 ciklusa		1 ciklus
Inicijalni korak	Denaturacija	Vezivanje prajmera	Elongacija	Finalna elongacija
95°C	95°C	55°C	72°C	72°C
7 min	30 sec	30 sec	40 sec	7 min

#### Vizuelizacija PCR produkata

Produkti PCR amplifikacije su pomešani sa Midori Green Direct bojom (Nippon Genetics) i analizirani na gel-elektroforezi na 2% agaroznom gelu (1xTBE) i vizuelizovani pod UV svetlom. U cilju determinacije veličine PCR produkata korišćena je komercijalna 100bp DNA lestvica (Nippon Genetics).

#### 4.2.5. Ispitivanje osetljivosti izolata *Prototheca* spp. na antibiotike i antimikotike disk difuzionom metodom

Osetljivosti izolata *P. zopfii* genotip 1 i 2 na antibiotike i antimikotike je isptana disk difuzionom metodom. Pripremljen je i standardizovan inokulum od kolonija *P. zopfii*, sa Sabouraud dekstroznog agara starih 24h, na sledeći način: nekoliko kolonija su uzete i suspenzovane u fiziološkom rastvoru do gustine 0,5 McFarland standarda (što iznosi od 1-3 x10<sup>6</sup> bakterija u mililitru). Od te suspenzije uzeto 0,5 mL i pravilno raspoređeno po površini Sabouraud dekstroznog agara, a zatim su postavljeni diskovi sa poznatom koncentracijom antimikotika. Na isti način je naneta suspenzija *P. zopfii* genotip 1 i 2 na Mueller Hinton agar, a zatim su postavljeni diskovi sa poznatom koncentracijom

antibiotika (Lassa 2007). Kao kontrola rasta upotrebljena je kultura referentnog soja *Candida albicans* ATCC 10231.

Diskovi antimikotika: amfotericin B (20 mcg, Abtek, UK), mikonazol (10 mcg, Abtek, UK), nistatin (100 iu, Abtek, UK), ketokonazol (10 mcg, Abtek, UK) i griseofluvin (10 mcg, Abtek, UK).

Diskovi antibiotika: marbofloksacin (5µg, Abtek, UK), gentamicin (10mcg, Abtek, UK), kanamicin (30µg, Torlak, Srbija), oksitetraciklin (10 mcg, Abtek, UK), streptomycin (30µg, Torlak, Srbija) i ceftazidim (30µg, Torlak, Srbija). Inkubacija primremljenih antibiogram i antimikrogram ploča je na 37°C 24h.

Na osnovu zona inhibicije, dobijenih tokom ispitivanja, izolati su razvrstani u tri terapijske kategorije:

-osetljivi (*Susceptible-S*) kod kojih postoje prihvatljive šanse za uspešnost terapije datim antibiotikom/antimikotikom a verovatnoća uspeha terapije je visoka nakon primene uobičajenih doza antibiotika, datih na uobičajeni način;

-intermedijarno ili umereno osetljivi (*Intermediate-I*) kod kojih se uspešnost terapije datim antibiotikom/antimokotikom ne može predvideti, a mogući uspeh terapije je ako se antibiotik da u maksimalnim koncentracijama i pareneteralnim putem;

-rezistentni (*Resistant-R*) – kod kojih postoji velika verovatnoća da izostane terapijski efekat datim antibiotikom i nikada se ne primenjuje u terapiji bez obzira na dozu, terapija je vrlo verovatno neuspešna.

Za mikonazol, nistatin, ketokonazol i griseofluvin dijametar zone osetljivosti (S) je veći ili jednak od 18 mm, zona intermedijarne osetljivosti (I) se kreće od 14 mm do 17 mm i zona rezistencije (R) je manja 14 mm. Vrednosti zone osetljivosti (S) za amfotericin B jeste veća ili jednaka 16 mm, zona intermedijalne osetljivosti (I) se kreće od 12 mm do 15 mm i zona rezistencije je manja od 12 mm (Lassa 2007). Čitanje zona osetljivosti za primenjene antibiotike je prikazana u Tabeli 5.

Tabela 5. Zone osetljivosti za antibiotike korišćene u radu (Lassa, 2007)

<b>Antibiotik</b>	<b>S</b>	<b>I</b>	<b>R</b>
<b>marbofloksacin</b>	$\geq 21$	16-20	$\leq 15$
<b>gentamicin</b>	$\geq 15$	13-14	$\leq 12$
<b>kanamicin</b>	$\geq 15$	14	$\leq 13$
<b>oksitetraciklin</b>	$\geq 19$	15-18	$\leq 14$
<b>streptomycin</b>	$\geq 15$	12-14	$\leq 11$
<b>ceftazidim</b>	$\geq 21$	15-20 $\leq$	$\leq 14$

#### 4.2.6. Statistička analiza podataka

U statističkoj analizi dobijenih rezultata izvedenog eksperimenta kao osnovne statističke metode koristili smo deskriptivne statističke pokazatelje. Ovi pokazatelji su nam omogućili opisivanje dobijenih eksperimentalnih rezultata i njihovo tumačenje. Od deskriptivnih statističkih pokazatelja koristili smo: meru centralne tendncije, interkvartilnu razliku, interval varijacije i koeficijent varijacije. Dalja statistička analiza odvija se u zavisnosti da li su analizirani podaci normalno distribuirani ili ne. Testiranje na normalnost izvedeno je je pomoću Kolmogorov-Smirnov (Kolmogorov-Smirnov) testa. U slučaju normalne distribucije podataka za poređenje signifikantnih razlika između eksperimentalnih grupa koristili smo parametarsku analizu varijans (One way analysis of variances). U slučaju kada distribucija podataka nije normalna upotreblavana je ne-parametarska Kruskal - Vallisova analiza varijanse (Kruskal Wallis Analysis of Variance on Ranks). U slučaju da postoje statistički signifikantne razlike između grupa, parovi grupa biće poređeni između sebe na osnovu parametarskog Tukievog testa, odnosno ne-parametarskog Dunn's Multiple Comparison testa. Signifikantnost razlika ustanovljavana je na nivoima značajnosti od 5 i 1 %. Svi dobijeni rezultati prikazani su tabelarno i grafički. Statistička analiza izvedenog eksperimenta urađena je u Statistical analysis of the results was elaborated using software GrapfPad Prism version 5.00 for Windows, GrapfPad Software, San Diego, California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com) i MS Excel-u.

## 5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

### 5.1. Rezultati izolacije i identifikacije alge *Prototheca* spp. i broja somatskih ćelija u mleku

Rezultati određivanja broja somatskih ćelija i nalaza algi iz roda *Prototheca* u uzorcima mleka uzetih iz četvrti vimena krava sa pozitivnim mastitis testom prikazani su u dva podpoglavlja.

#### 5.1.1. Rezultati izolacije i identifikacije alge *Prototheca* spp.

Od 494 četvrti odabrane za ispitivanje na osnovu pozitivnog mastitis testa, mikroskopskom metodom broj iznad 500.000 somatskih ćelija u mililitru je utvrđen 460 uzorka. Alge iz roda *Prototheca* su izolovane iz 39 uzoraka mleka uzetih iz četvrti vimena krava u kojima je broj somatskih ćelija bio iznad 500.000 u mililitru. Krave koje su obolele od kliničkog mastitisa imale su promenjeno mleko, sa primensama krpica, bile su bez poremećaja opšteg stanja i sa očuvanim apetitom. Promene u mleku kod kliničkog mastitisa bile su prisutne samo u jednoj četvrti. Na osnovu makroskopskog izgleda izraslih kolonija na Sabouraud dekstroznom agaru (Slika 4) i nalaza na mikroskopskom preparatu (Slika 5 i 6) identifikovane su alge iz roda *Prototheca*.

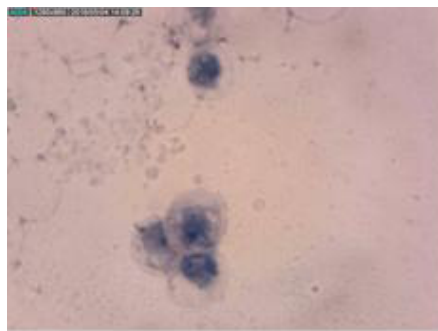


Slika 4. Izgled kolonija *Prototheca* spp. na Sabouraud dekstroznom agaru





Slika 5. Izgled na mikroskopskom preparatu *Prototheca* spp (uvećanje 1000x)  
Bojenje po Dif Quick



Slika 6. Izgled na mikroskopskom preparatu *Prototheca* spp (uvećanje 1000x)  
Bojenje po Gimzi

Ni iz jednog od 30 uzoraka vode kojom su napajane životinje, 8 briseva uzetih sa podova, 5 briseva uzetih sa opreme za mužu i 24 uzorka briseva sa pojilica nisu izolovane alge iz roda *Prototheca*.

Rezultati ispitivanja učestalosti mastitisa izazvanih algama iz roda *Prototheca* na 5 ispitivanih farmi prikazani su u tabeli 6.

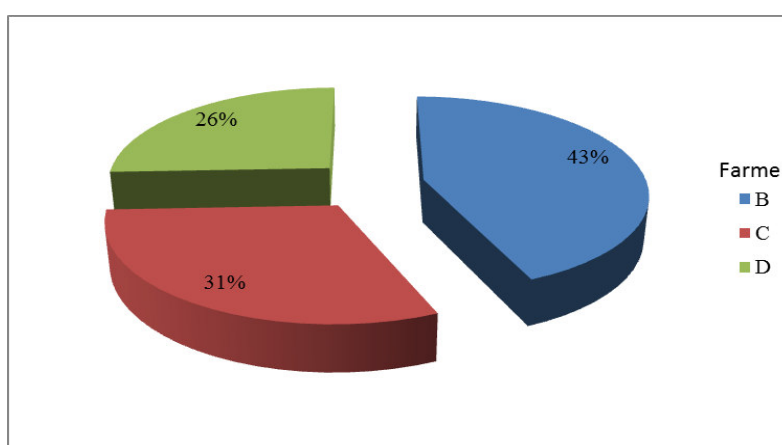
Tabela 6. Rezultati broja kliničkih i supkliničkim mastitisa izazvanih algama iz roda *Prototheca*

Ispitivane farme	Ukupno uzoraka mleka	Broj uzoraka mleka sa SCC>500.000	Broj izolovanih <i>Prototheca</i> spp.	Supklinički mastitisi	Klinički mastitisi
A	70	70	-	-	-
B	148	98	17	13	4
C	142	128	12	10	2
D	93	83	10	9	1
E	41	41	-	-	-
ukupno	494	420	39	32	7

Ni iz jednog od 70 uzoraka mleka poreklom sa farme A i 41 uzorka mleka poreklom sa farme E uzetih iz četvrti vimena krava sa pozitivnim CMT-om nisu izolovane alge iz roda *Prototheca*. Pozitivan CMT je utvrđen kod 98 od 148 krava obuhvaćenih ispitivanjem poreklom sa farme B, a alge iz roda *Prototheca* su izolovane iz 13 uzoraka u slučaju supkliničkih i 4 uzorka u slučaju kliničkih mastitisa. Sa farme C ukupno je ispitano 142 krava, pozitivan CMT je utvrđen

kod 128 krava, a alge iz roda *Prototheca* su izolovane iz uzoraka mleka 10 krava sa supkliničkim mastitisom i 2 krave sa kliničkim mastitisom. Pozitivan CMT je utvrđen kod 83 od 93 krave obuhvaćene ispitivanjem poreklom sa farme D, a alge iz roda *Prototheca* su izolovane iz 9 uzoraka u slučaju supkliničkih i jednog uzorka u slučaju kliničkih mastitisa.

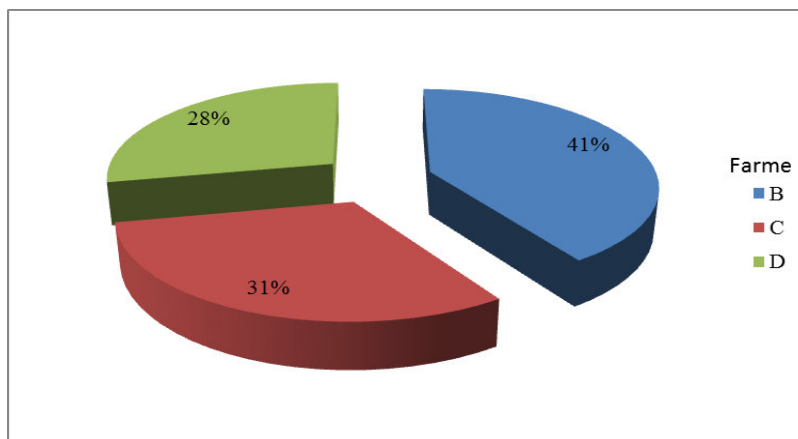
Mastitisi izazvani prototekama su dokazani na tri (B, C, D) od 5 farmi. Od 39 mastitisa izazvanih algama iz roda *Prototheca*, u 32 slučaja su bili supklinički mastitisi, a u 7 slučajeva su bili klinički mastitisi. Procentualna zastupljenost mastitisa na farmama B, C, i D je prikazana na slici 7.



Slika 7. Procentat zastupljenosti izolata *Prototheca* spp. na farmama B, C i D

Rezultati prikazani na slici 7 pokazuju da su mastitisi izazvani prototekama najčešće dokazani na farmi B u 17 (43%) slučajeva zatim na farmi C u 12 (31%) slučajeva i na farmi D u 10 (26%) slučajeva.

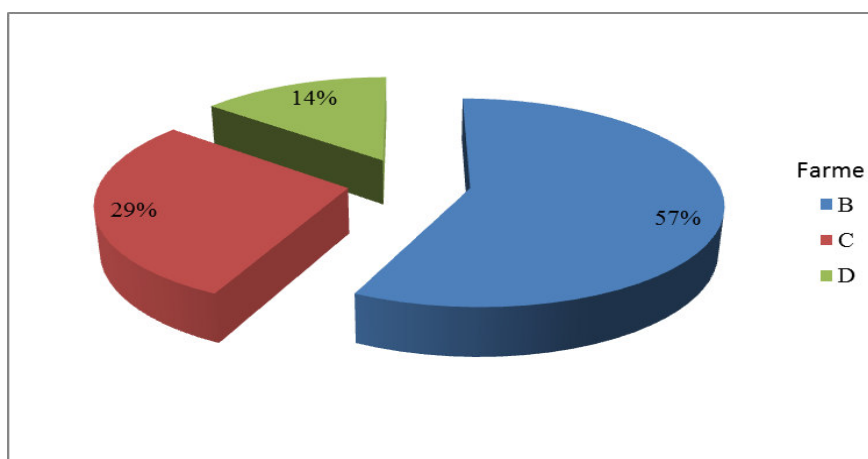
Učestalost supkliničkih mastitisa na farmama B, C i D je prikazana na slici 8.



Slika 8. Procenat supkliničkih mastitisa izazvanih *Prototheca* spp. na farmama B, C i D

Prikazani rezultati pokazuju da je supklinički mastitis izazvan algama iz roda *Prototheca* najčešće dokazan na farmi B u 13 (41%), zatim na farmi C u 10 (31%) i farmi D 9 (28%) slučajeva.

Rezultati ispitivanja učestalosti kliničkih mastitisa izazvanih algama iz roda *Prototheca* prikazani su na slici 9.



Slika 9. Procenat kliničkih mastitisa izazvanih *Prototheca* spp. na farmama B, C i D

Prikazani rezultati pokazuju da je klinički mastitis izazvan algama iz roda *Prototheca* najčešće dokazan na farmi B u 4 (57%), zatim na farmi C u 2 (29%) i farmi D u jednom (14%) slučaju.

## 5.1.2. Rezultati broja somatskih ćelija u mleku krave i nalaz

### *Protortheca* spp u uzorcima mleka iz četvrti vimena krava

Rezultati ispitivanja nalaza algi iz roda *Prototheca* u uzorcima mleka uzeti iz četvrti vimena krava sa pet farmi prikazani su u tabeli 7.

Tabela 7. Zastupljenost alge iz roda *Prototheca* na ispitivanim farmama

Ispitivane farme	Broj ispitanih uzoraka	Nisu izolovane <i>Prototheca</i> spp.		Izolovane <i>Prototheca</i> spp.	
		Broj	%	Broj	%
A	70	70	100	-	-
B	148	131	88,52	17	11,48
C	142	130	91,15	12	8,86
D	93	83	89,23	10	10,66
E	41	41	100	-	-
Ukupno	494	455	92,10	39	7,90

Alge iz roda *Prototheca* su izolovane iz 7,90% uzoraka mleka uzetih iz četvrti vimena krava.

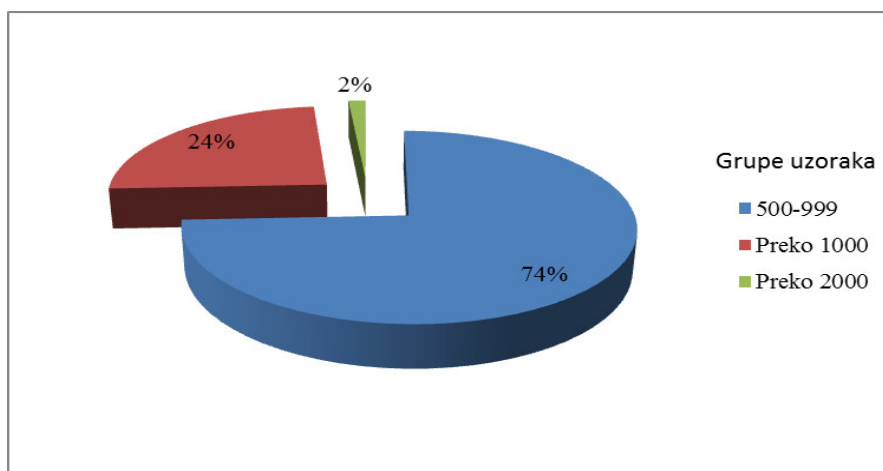
Odnos između broja somatskih ćelija u uzorcima mleka uzetim iz četvrti vimena krava i nalaza algi iz roda *Prototheca* su prikazani u tabelama od 8 do 12 i na slikama 10 i 11. Na osnovu broja somatskih ćelija mililitru mleka uzorci su razvrstani u sedam grupa. U prvu grupu su svrstani uzorci sa brojem somatskih ćelija ispod 499.999, u drugu grupu su svrstani uzorci sa brojem somatskih ćelija od 500.000 do 1.000.000, u treću grupu od 1.000.000 do 2.000.000, u četvrtu grupu od 2.000.000 do 3.000.000 u petu grupu 3.000.000 do 4.000.000, šestu grupu od 4.000.000 do 5.000.000 i sedmu grupu preko 5.000.000

Tabela 8. Broj somatskih ćelija u uzorcima mleka uzetim iz četvrti vimena krava i nalaz algi iz roda *Prototheca* na farmi A

Broj SCC/ mL (000)	Nisu izolovane <i>Prototheca</i> spp		Izolovane <i>Prototheca</i> spp.	
	Broj	Procenat	Broj	Procenat
Ispod 499	-	-	-	-
500-1000	52	74,28	-	-
Preko 1000	17	24,28	-	-
Preko 2000	1	1,44	-	-
Ukupno	70	100	-	-

Iz rezultata prikazanih u tabeli 8 zapaža se da se broj somatskih ćelija u uzorcima mleka kretao od 500.000. do preko 2.000.000 u mL, a ni iz jednog uzorka nisu izolovane alge iz roda *Prototheca*.

Procentualna zastupljenost broja somatskih ćelija po grupama u uzorcima mleka sa farme A je prikazana na slici 10.



Slika 10. Prikaz broja somatskih ćelija u mleku na farmi A

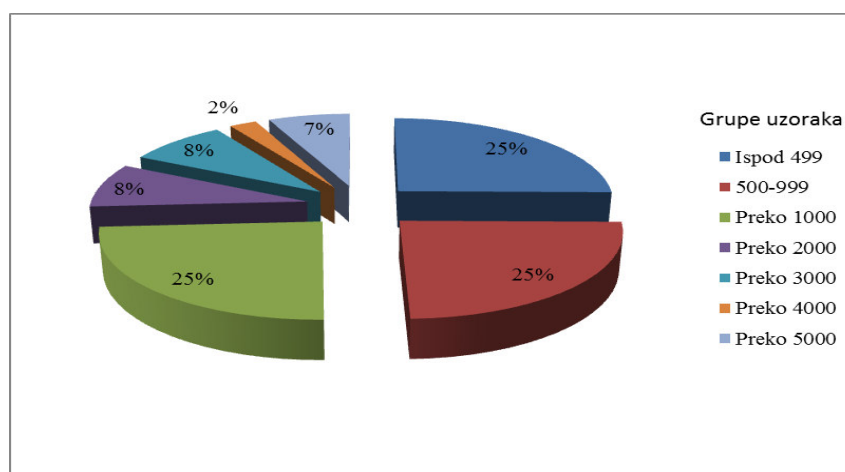
U najvećem procentu (74%) uzoraka mleka broj somatskih ćelija se kretao ispod 1.000.000 u mL, a samo u 2% uzoraka broj somatskih ćelija je bio iznad 2.000.000 u mL.

Tabela 9. Broj somatskih ćelija u uzorcima mleka uzetim iz četvrti vimena krava i nalaza algi iz roda *Prototheca* na farmi B

Broj SCC/ mL (000)	Nisu izolovane <i>Prototheca</i> spp		Izolovane <i>Prototheca</i> spp	
	Broj	Procenat	Broj	Procenat
Ispod 499	33	25,19	-	-
500-999	32	24,42	1	5,88
Preko 1000	32	24,42	4	23,52
Preko 2000	11	8,39	4	23,52
Preko 3000	11	8,39	2	11,76
Preko 4000	3	2,29	3	17,64
Preko 5000	9	6,87	3	17,64
Ukupno	131	100	17	100

Rezultati prikazani u tabeli 9 pokazuju da su alge iz roda *Prototheca* izolovane iz uzoraka mleka u kojima je broj somatskih ćelija bio iznad 500.000 mL. Broj somatskih ćelija u uzorcima mleka uzetih iz četvrti vimena krava iz kojih su izolovane alge iz roda *Prototheca* se kretao od 499.999 do preko 5.000.000 u mL.

Procentualna zastupljenost broja somatskih ćelija po grupama u uzorcima mleka sa farme B je prikazana na slici 11.



Iz rezultata prikazanih na slici 11 zapaža se da je u po 25% uzoraka mleka iz četvrti vimena krava broj somatskih ćelija kretao ispod 499.999 u mL, od 500.000 do 1.000.000 u mL i od 1.000.000 do 2.000.000

Tabela 10. Broj somatskih ćelija u uzorcima mleka uzetim iz četvrti vimena krava i nalaza algi iz roda *Prototheca* na farmi C

Broj SCC/ mL (000)	Nisu izolovane <i>Prototheca</i> spp		Izolovane <i>Prototheca</i> spp	
	Broj	Procenat	Broj	Procenat
Ispod 499	2	1,53	-	-
500-999	91	70,00	6	50,00
Preko 1000	29	22,31	-	-
Preko 2000	4	3,07	2	16,66
Preko 3000	3	2,30	-	-
Preko 4000	1	0,76	1	8,34
Preko 5000	2	1,53	3	25,00
Ukupno	130	100	12	100

Broj somatskih ćelija u uzorcima mleka uzetim iz četvrti vimena krava na farmi C se kretao od ispod 499.999 do iznad 5.000.000 u mL. U najvećem procentu (70%) broj somatskih ćelija je bio između 500.000 i 1.000.000 u mL i iz ovih uzorak mleka su najčešće izolovane alge iz roda *Prototheca*.

Tabela 11. Broj somatskih ćelija u uzorcima mleka uzetim iz četvrti vimena krava i nalaza algi iz roda *Prototheca* na farmi D

Broj SCC/ mL (000)	Nisu izolovane <i>Prototheca</i> spp		Izolovane <i>Prototheca</i> spp	
	Broj	Procenat	Broj	Procenat
Ispod 499	-	-	-	-
500-999	41	49,39	3	30
Preko 1000	29	34,93	5	50
Preko 2000	7	8,43	1	10
Preko 3000	4	4,82	-	-
Preko 4000	2	2,42	-	-
Preko 5000	1	1,21	1	10
Ukupno	83	100	10	100

Broj somatskih ćelija u uzorcima mleka uzetim iz četvrti vimena krava na farmi C se kretao od 500.000 do iznad 5.000.000 u mL. U najvećem procentu (49,39%) broj somatskih ćelija je bio između 500.000 i 1.000.000 u mL, a zatim u 34,93% uzoraka između 1.000.000 i 2.000.000 u mL i iz ovih uzorak mleka su najčešće izolovane alge iz roda *Prototheca*.

Tabela 12. Broj somatskih ćelija u uzorcima mleka uzetim iz četvrti vimena krava i nalaza algi iz roda *Prototheca* na farmi E

Broj SCC/ mL (000)	Nisu izolovane <i>Prototheca</i> spp		Izolovane <i>Prototheca</i> spp	
	Broj	Procenat	Broj	Procenat
Ispod 499	-	-	-	-
500-999	28	68,29	-	-
Preko 1000	13	31,71	-	-
Preko 2000	-	-	-	-
Preko 3000	-	-	-	-
Preko 4000	-	-	-	-
Preko 5000	-	-	-	-
Ukupno	41	100	-	-

Iz rezultata prikazanih u tabeli 12 zapaža se da se broj somatskih ćelija u uzorcima mleka kretao od 500.000 do 2.000.000 u mL, a ni iz jednog uzorka nisu izolovane alge iz roda *Prototheca*

Statistički pokazatelji analize broja somatskih ćelija na ispitivanim farmama su prikazani u tabeli 13.

Tabela 13. Statistiki pokazatelji analize broja somatskih ćelija na ispitivanim farmama ( $\times 10^3$ )

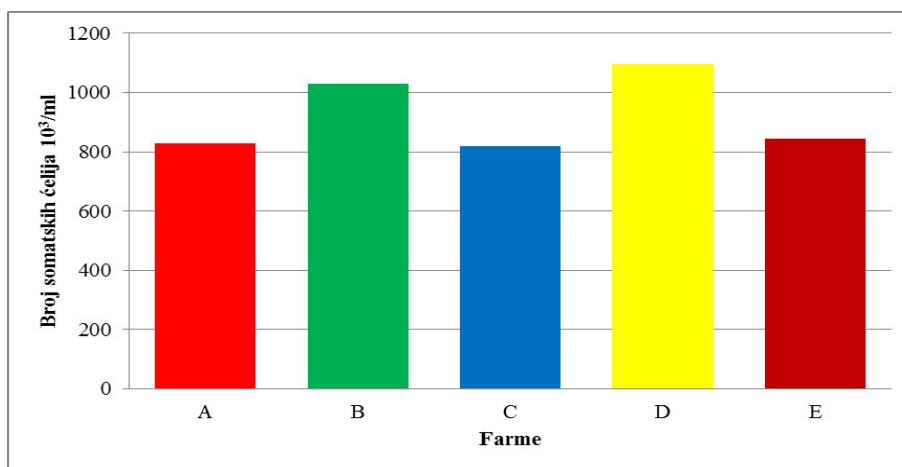
Oznaka farme	n	Me	IQR	CV (%)	X max	X min
A	47	830,00	725,00	46,39	2167	506
B	135	1030,00	1718,00	130,27	13267	39
C	132	817,50	459,50	85,58	7118	491



<b>D</b>	84	1096,00	997,50	75,40	6307	500
<b>E</b>	41	845,00	525,50	36,45	1988	515

Statistička signifikantnost prikazana je istim slovima: A,  $p < 0,05$

Kako podaci nisu bili normalno distribuirani analiza dobijenih rezultata obavljena je pomoću medijane (*Me*) i inerkvartilne razlike (*IQR*). Analizom je ustanovljeno da su prosečne vrednosti broja somatskih ćelija u uzorcima mleka sa farme D najveće (1096,00 sa *IQR* 999,50), dok je najmanji broj somatskih ćelija zabeležen u uzorcima mleka uzetim iz četvrti vimena krava na farmi A (830,00 sa *IQR* 725,00). Kako podaci o broju somatskih ćelija nisu normalno distribuirani testiranje je urađeno neparametrijskim statističkim metodama i nisu ustanovljene signifikantne razlike ( $p > 0,05$ ). Na osnovu koeficijenta korelacije ustanovljeno je veliko variranje podataka u ispitivanim serijama koje se kretalo od 36,45% na farmi E do 130,27% na farmi B.



Grafikon 1. Grafički prikaz prosečnih vrednosti (*Me*) broja somatskih ćelija u uzorcima mleka uzetim iz četvrti vimena krava ( $\times 10^3$ )

Iz grafikona 1. zapaža se da je najveći prosečan broj somatskih ćelija u uzorcima mleka uzetim iz četvrti vimena bio na farmi D, zatim na farmi B, farmi E, farmi A i farmi C.

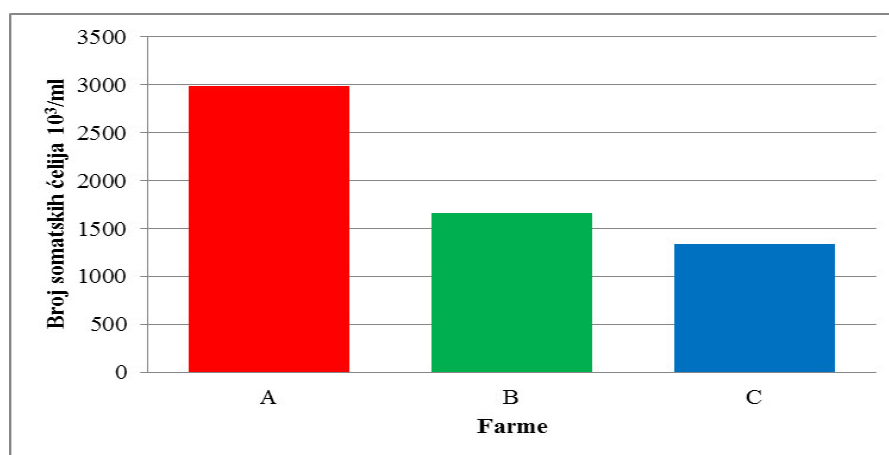
Tabela 14. Statistiki pokazatelji analize broja somatskih ćelija ( $\times 10^3$ ) u uzorcima iz četvrti na farmama gde su izolovane alge iz roda *Prototheca*

Oznaka farme	n	Me	IQR	CV (%)	X max	X min
B	17	2985,00	5877,00	90,21	13367	651
C	12	1658,00	4385,00	80,20	7118	569
D	10	1344,00	959,20	96,12	6307	521

Statistička signifikantnost prikazana je istim slovima: A,  $p < 0,05$

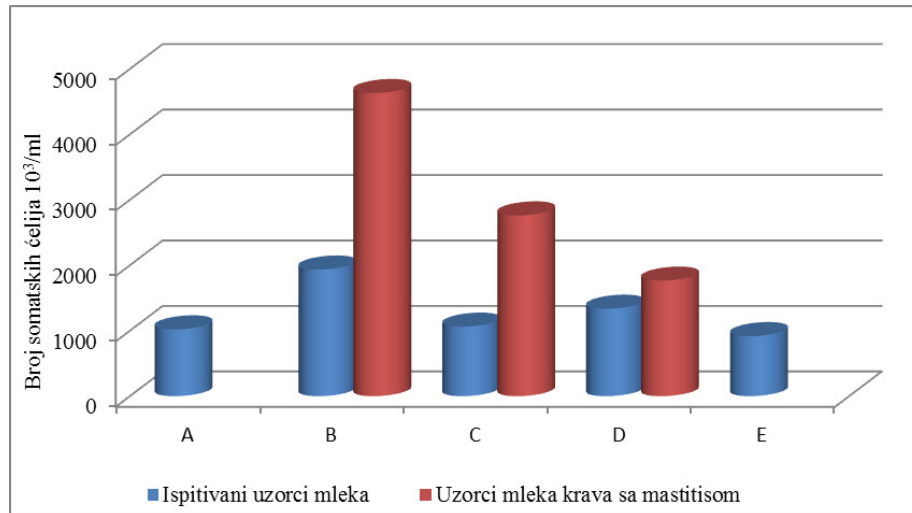
Analizirajući prosečne vrednosti broja somatskih ćelija obolelih krava ustanovljeno je da je najveće prosečne vrednosti (2985,00 sa IQR od 5877,00) u uzorcima mleka uzetim iz četvrti vimena krava na farmi B, dok je najmanji broj somatskih ćelija (1344,00 sa IQR od 959,20) utvrđen u uzorcima mleka uzetim iz četvrti vimena krava na farmi D. Kako podaci o broju somatskih ćelija nisu normalno distribuirani testiranje je urađeno neparametrijskim statističkim metodama i nisu ustanovljene signifikantne razlike ( $p > 0,05$ ). Na osnovu koeficijenta korelacije ustanovljeno je veliko variranje podataka u ispitivanim serijama koje se kretalo od 80,20% na farmi C do 96,12% na farmi D.

Prosečan broj somatskih ćelija u uzorcima mleka sa ispitivanih farmi gde su izolovane alge iz roda *Prototheca* prikazan je na grafikonu 2.



Grafikon 2. Grafički prikaz prosečnih vrednosti broja somatskih ćelija u uzorcima mleka uzetim iz četvrti vimena krava gde su izolovane alge iz roda *Prototheca* spp. ( $\times 10^3$ )

Iz grafikona 2 zapaža se da je najveći prosečan broj somatskih ćelija u uzorcima mleka uzetih iz pojedinih četvrti vimena sa gde su izolovane alge iz roda *Prototheca* bio na farmi B, zatim na farmi C i farmi D.



Grafikon 3. Uporedi prikaz broja somatskih ćelija u svim uzorcima mleka sa farmi i iz četvrti vimena krava iz kojih su izolovane alge iz roda *Prototheca*

Najveći prosečan broj somatskih ćelija u uzorcima mleka uzetim iz četvrti vimena krava kao i najveći prosečan broj somatskih ćelija u uzorcima mleka iz kojih su izolovane alge iz roda *Prototheca* bio je na farmi B, zatim na farmi C i na farmi D.

Broj somatskih ćelija u uzorcima sekreta mlečne žlezde u slučajevima kliničkog mastitisa je prikazan u tabeli 15.

Tabela 15. Broj somatskih ćelija u sekretu mlečne žlezde u slučaju kliničkog mastitisa izazvanog algama iz roda *Prototheca*

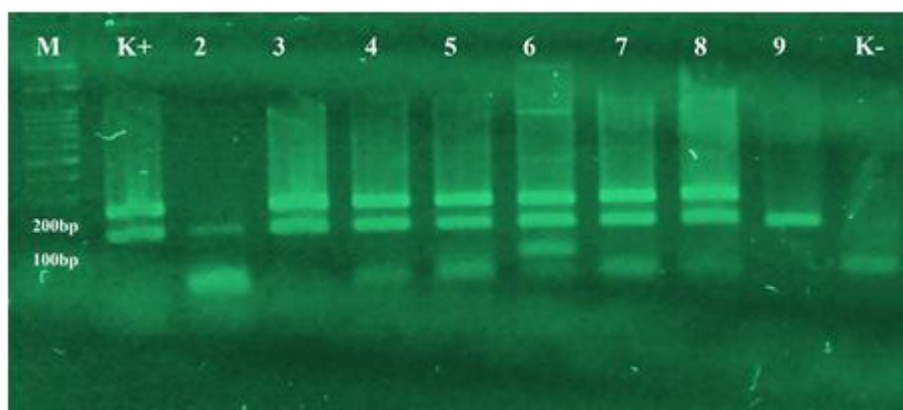
Broj uzorka	SCC x 10 <sup>3</sup> / mL
1.	10. 120
2.	10.523
3.	12. 369
4.	13 .267
5.	5. 337

6.	7. 116
7.	6. 307

Rezultati prikazani u tabeli 15 pokazuju da je broj somatskih ćelija u mleku krava sa kliničkim mastitisa bio značajno povećan i kretao se od 5 337 000 do 13 267 000 u mL.

## 5.2. Rezultati identifikacije alge *Prototheca* spp. PCR tehnikom

Ukupno izolovanih *Prototheca* spp. od 494 uzorka mleka krava sa kliničkim i supkliničkim mastitisom bilo je 39, od toga kao *Prototheca zopfii* genotip 2 je identifikovano 37 (94,87%) izolata, a samo dva izolata je identifikovano kao *Prototheca zopfii* genotip 1 odnosno 5,13%. Na slici 12 prikazana elektroforeza na agaroznom gelu fragmenata DNK *P. zopfii*, na kojoj se jasno uočava prisustvo fragmenata dužine 233 bp koji je zajednički za sve genotipove *P. zopfii*. Replikon dužine 163 bp specifičan je za *P. zopfii* genotip 2, a replikon dužine 150 bp odgovara *P. zopfii* genotip 1.



Slika 12. Prikaz elektroforeze na agaroznom gelu PCR proizvoda DNK fragmenata *P. zopfii*; M – Ladder; (K+) pozitivna kontrola, 2- 9 – uzorci kojima je detektovana DNK *P. zopfii*; 2-8 *P. zopfii* genotip 2 (163bp, 233bp) 9 - *P. zopfii* genotip 1 (150bp, 233bp), (K-) negativna kontrola

### 5.3. Rezultati ispitivanja oseljivosti izolata *Prototheca zopfii* na odabrane antibiotike i antimikotike

Ukupno je ispitano 37 izolata *P. zopfii* genotip 2 i dva izolata *P. zopfii* genotip 1, a kao referentni soj korišćena je *Candide albicans* ATCC 10231. Ispitivanja su izvedena sa 6 antibiotika (Slika13), (marbofloksacin, gentamicin, kanamicin, oksitetraciklin, streptomycin i ceftazidin) i 5 antimikotika (amfotericin B, mikonazol, nistatin, ketokonazol i griseofulvin) (Slika14).



Slika 13. Antibiogram



Slika 14. Antimikogram

Referentni soj *Candide albicans* ATCC 10231 je bio rezistentan na sve ispitivane antibiotike i od antimikotika na mikonazol i griseofulvin. Intermedijarnu oseljivost referentni soj je pokazao na amfotericin B, a bio je oseljiv na nistatin i ketokonazol.

Rezultati dobijeni ispitivanjem oseljivosti *P. zopfii* na antibiotike prikazani su u tabeli 16.

Tabela 16. Oseljivost *P. zopfii* na odabrane antibiotike

Oseljivost	MF		GE		KN		OT		ST		CZ	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
S	2	5,12	6	15,38	9	23,07	-	-	16	41,03	-	-
I	-	-	12	30,76	7	17,93	-	-	10	25,64	-	-
R	37	94,88	21	53,86	23	58,97	39	100	13	33,33	39	100
Ukupno uzoraka	39	100	39	100	39	100	39	100	39	100	39	100

S oseljivi, I intermedijarno (umereno) oseljivi, R rezistentni

MF-marbofloksacin, GE-gentamicin, KN-kanamicin, OT-oksitecuklin, ST-streptomycin, CZ-ceftazidim

Rezultati prikazani u tabeli 16 pokazuju da su svi izolati oba genotipa *P. zopfii* (100%) bili rezistentni na oksitetraciklin i ceftazidim. Dva izolata (5,12%) *P. zopfii* su bili osetljivi, a 37 (94,88%) izolata je bilo rezistentno na marbofloksacin. Izolati *P.zopfii* su bili osetljivi na gentamicin u malom procentu, i to 6 izolata (15,38%), intermedijarna osetljivost je utvrđena kod 12 (30,76%) izolata i 21 (53,86%) izolat je bio rezistentan. Rezultati osetljivosti izolata *P. zopfii* na kanamicin su sledeći: 9 (23,09%) izolata je osetljivo, 7 (17,93) izolata je pokazalo intermedijarnu osetljivost i 23 (58,97%) izolata su bila rezistentna. Najveći broj izolata *P. zopfii* njih 16 (41,03%) je bilo osetljivo na streptomycin, 10 (25,64%) je pokazalo intermedijarnu osetljivost a njih 13 (33,33%) je bilo rezistentno.

Rezultati dobijeni ispitivanjem osetljivosti *P. zopfii* na antimikotike prikazani su u tabeli 17.

Tabela 17. Osetljivost *P. zopfii* na odabrane antimikotike

Zona osetljivosti	AMB		MK		NI		KE		GR	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<b>S</b>	-	-	-	-	25	64,14	-	-	-	-
<b>I</b>	16	41,03	-	-	6	15,38	5	12,82	-	-
<b>R</b>	23	58,97	39	100	8	20,51	34	87,18	39	100
<b>Ukupno uzoraka</b>	39	100	39	100	39	100	39	100	39	100

S osetljivi, I intermedijarno (umereno) osetljivi, R rezistentni

AMB-amfotericin B, MK- mikonazol, NI- nistatin, KE- ketokonazol, GR- griseofulvin

Rezultati prikazani u tabeli 17, pokazuju da su svi izolati *P. zopfii* (100%) bili rezistentni na mikonazol i griseofulvin. Nijedan izolat *P. zopfii* bio osetljiv na amfotericin B. Intermedijarna osetljivost je utvrđena prema amfotericin B kod 16 (41,03%) izolata, a 23 (58,97%) izolata *P. zopfii* je bilo rezistentno na navedeni antimikotik. Najveći broj izolata *P. zopfii* je bio osetljiv na nistatin 25 (64,14%), intermedijarno osetljivih je bilo 6 (15,38%), a rezistentnih je bilo 8 (20,51%). Nijedan izolat *P. zopfii* nije bio osetljiv na ketokonazol, intermedijarno osetljivih je bilo 5 (12,82%), a rezistentnih je bilo 34 (87,18%) izolata.

## 6. DISKUSIJA

### 6.1. Izolacija i identifikacija *Prototheca* spp. iz mleka i broj somatskih ćelija

Mastitisi izazvani algama predstavljaju ekonomski problem, zbog dugotrajnog i neuspešnog lečenja, smanjenja produkcije mleka i velikog broja somatskih ćelija u mleku. Poslednjih godina incidencija mastitisa goveda izazvanih algama iz roda *Prototheca* se povećava, pa su ovi mastitisi u žiži interesovanja naučne i stručne javnosti ne samo zbog ekonomskih gubitaka već i zbog potencijalnog uticaja *Prototheca* spp. na javno zdravlje (Jánosi i sar., 2001; Roesler i Hensel, 2003). U literaturi ima više podataka o medijumima i uslovima temperature pri kojima se izoluju alge iz roda *Prototheca*. Najveći broj istraživača navodi da se alge iz roda *Prototheca* uspešno izoluju na Sabouraud dekstroznom agaru pri temperaturi od 37 °C u vremenu od 48-72 sata (Gao i sar. 2012; Marques, 2010b; Roesler i sar. 2001; Janosil i sar.2001.). Međutim, Onozaki i saradnici (2013) navode da se alge iz roda *Prototheca* najbolje izoluju pri temperaturi od 25 °C, a Zaini i saradnici (2012) smatraju da je inkubacija u trajanju od 48-72h pri temperaturi od 27°C najpogodnija za izolovanje ove alge. Rezultati dobijeni u našim istraživanjima su u saglasnosti sa rezultatima više istraživača (Gao i sar. 2012; Marque, 2010; Roesler i sar. 2001; Janosil i sar.2001) da se alge iz roda *Prototheca* izoluju na Sabouraud dekstroznom agaru posle inkubacije od 48-72h pri temperaturi od od 37 °C. Alge iz roda *Prototheca* rastu i na krvnom agaru. Na osnovu izgleda kolonija može da ih prepozna samo iskusan mikrobiolog.

Krukowski i sar. (2013) su na osnovu morfološkog izgleda i rasta na 4% dekstroznom agaru izolovali i indentifikovali 15 uzoraka *P. zopfii* koje potiču iz mleka krava sa supkliničkim i kliničkim mastitisom u Poljskoj i ispitali minimalnu mikrobialnu koncentraciju (MMCs - Minimal Microbicidal Concentrations) na hlorheksidinske i jodne preparate i preporučuju ih kao dezinfekciona sredstva. Malinovski i saradnici (2002) su na Sabouraud dekstroznom agaru izolovali *Prototheca* spp. kod 25 (89%) krava od 28 ispitanih sa znacima kliničkih i supkliničkih mastitisa.

Alge iz roda *Prototheca* dovode do porasta broja somatskih ćelija u mleku u slučaju supkliničkih mastitisa, što utiče na broj somatskih ćelija u mleku sa farme, a time na cenu mleka, kao i prihvatljivost mleka za ishranu ljudi. Broj somatskih ćelija u uzorcima mleka uzetim iz četvrti vimena krava sa supkliničkim mastitisom uzrokovanim algama iz roda *Prototheca* se kretao od 500.000 do preko 5.000.000 u mililitru mleka. Rezultati naših ispitivanja su u saglasnosti sa rezultatima Malinowski i saradnika (2002) koji su u slučajevima supkliničkih mastitisa izazvanih ovim algama utvrdili broj somatskih ćelija od 591.000 do 3.072.000 /ml mleka kao i nalazima Jagielski i saradnika (2011) koji su u slučaju supkliničkih mastitisa utvrdili broj somatskih ćelija od 434.000 do 1.325.000 /ml. U slučaju kliničkih mastitisa broj somatskih ćelija u mleku, dobijen u našim ispitivanjima, je bio između 521.000 do 13.367.000 u mililitru. U najvećem broju uzoraka mleka u slučaju kliničkih mastitisa, izazvanih algom iz roda *Prototheca*, broj somatskih ćelija je bio iznad 7.118.000 u mililitru. Rezultati naših ispitivanja su u saglasnosti sa rezultatima Malinowski i saradnika (2002) koji su u slučajevima kliničkih, mastitisa izazvanih ovom algom, utvrdili broj somatskih ćelija od 6. 816.000 do 23.495.000 u 1 ml, kao i Jagielski i saradnika (2011) koji su u slučajevima kliničkih mastitisa utvrdili broj somatskih ćelija koji se kretao od 1.637.000 do 18.442.000/ml.

U literaturi ima malo podataka o mastitisima izazvanim algama iz roda *Prototheca* u odnosu na podatke o uzročnicima kontagioznih mastitisa. Najveći broj istraživača je genotipizacijom alge iz roda *Prototheca* najčešće identifikovao *P. zopfii* genotip 2. Jagielski i saradnici (2011) su u Poljskoj iz 44 uzorka mleka, koja potiču od krava sa mastitisom izolovanim algama iz roda *Prototheca*, od kojih su primenom PCR tehnike 43 (98%) izolata identifikovali kao *P. zopfii* genotip 2, a jedan izolat kao *P. blaschkeae*. Najčešće su kao uzročnika mastitisa izolovali i identifikovali *P. zopfii* genotip 2 kako u slučaju kliničkih (33 izolata) tako i supkliničkih (11 izolata) mastitisa. Janosil i saradnici (2001) su dokazali mastitise izazvane *P. zopfii* u 62 (96,8%) četvrti vimena krava. Broj somatskih ćelija u 1 mL mleka iz četvrti vimena krava obolelih od mastitisa izazvanih ovom algom se kretao od 6 do 9 miliona.



Ahrholdt i saradnici (2011) su u Nemačkoj iz 200 uzoraka mleka, koji potiču od krava sa mastitisima izazvanim algama iz roda *Prototheca*, primenom PCR tehnike u 177 (88,5%) slučajeva identifikovali *Prototheca zopfii* genotip 2, 21 (10,5%) izolat je identifikovan kao *P. blaschkeae*, a 2 (1%) izolata kao *Prototheca zopfii* genotip 1. Slične rezultate, o zastupljenosti genotipova algi iz roda *Prototheca* izolovanih iz četvrti vimena krava u slučajevima mastitisa isti autori su dobili u 2012. godini genotipizacijom 344 izolata. Najčešće su identifikovali *Prototheca zopfii* genotip 1 kod 310 (90,6%) izolata, zatim *Prototheca zopfii* genotip 2 kod 30 (8,8%) izolata, *P. blaschkeae* kod jednog izolata (0,3%) i *Prototheca zopfii* genotip 1 kod jednog izolata (0,3%). Druga grupa autora iz Nemačke Moller i sar. (2007), su genotipizacijom 30 izolata algi iz roda *Prototheca* primenom PCR sve izolate identifikovali kao *P. zopfii* genotip 2.

Rezultati dobijeni u našim istraživanjima genotipizacijom algi iz roda *Prototheca* su usaglasnosti sa rezultatima Malinowski i saradnika (2002) Jagielski i saradnika (2011) Janosil i saradnika (2001), Ahrholdt i saradnika (2011) i Moller i saradnika (2007), koji su najčešće kao uzročnika mastitisa identifikovali *Prototheca zopfii* genotip 2. Naši rezultati nisu u saglasnosti sa rezultatima Zaini i saradnika (2012) koji su u Iranu *P. zopfii* genotip 2 identifikovali samo kod 4 (3,07%) algi iz roda *Prototheca* izolovanih u slučaju mastitisa.

Glavni izvor infekcije vimena krava su alge iz roda *Prototheca* poreklom iz okruženja. Da bi utvrdili izvor infekcije vimena krava Ricchi i sar. (2010) su ispitali 411 uzorka prostirke, fecesa, vode za napajanje goveda i vode za pranje kao i sa različitih površina u štalama sa 24 farme muznih krava, kao i 3208 uzorka mleka. Alge iz roda *Prototheca* su izolovali iz 69 uzoraka iz okoline i 239 uzoraka mleka iz četvrti vimena krava. Genotipizacijom izolata algi iz roda *Prototheca* primenom PCR tehnike najčešće su identifikovali *P. zopfii* genotip 2 kod 97,2% izolata, zatim *Prototheca blaschkeae* kod 13,2% izolata i *P. zopfii* genotip 1 kod 1,9% izolata. Iz okoline alge iz roda *Prototheca* su izolovane samo iz vode za napajanje (53 uzorka). Genotipizacijom su svi izolati poreklom iz vode su identifikovani kao *P. zopfii* genotip 2.

Gao i saradnici (2012) su pored uzoraka (23 uzorka) mleka krava sa zancima kliničkog mastitisa i 46 uzoraka poreklom od krava neuspešno lečenih od mastitisa izazvanih algama iz roda *Prototheca* ispitali i 15 uzoraka hrane za životinje, fecesa i vode, 20 uzoraka prostirke i 10 briseva sa kože papila. Izolovali su i primenom PCR tehnike identifikovali *P. zopfii* iz 17 (74%) uzoraka mleka iz četvrti vimena krava i iz uzoraka uzetih iz vimena krava neuspešno lečenih od mastitisa izazvanih ovim algama. Od uzoraka uzetih iz okoline *P. zopfii* je izolovana u samo iz 2 (2,7%) uzorka vode za napajanje krava.

Za razliku od Gao i sar. (2012) i Ricchi i sar. (2010) koji su iz uzoraka vode za napajanje izolovali alge iz roda *Prototheca*, mi u našim istraživanjima iz vode nismo izolovali navedene alge. Međutim, naši rezultati su u saglasnosti sa drugim rezultatima navedenih autora koji kao i mi u našim istraživanjima iz uzoraka briseva uzetih sa podova, sa opreme i pojilice nisu izolovali algu iz roda *Prototheca*.

Mastitisi izazvani algama iz roda *Prototheca* su dokazani i u Republici Srbiji. Milanov i sar. (2006) su ispitivanjem 73 uzorka mleka uzetih od krava obolelih od mastitisa poreklom sa farmi iz Vojvodine izolovali i na osnovu izgleda kolonija na Sabouraud dekstroznom agaru i izgleda na mikroskopskom preparatu identifikovali *P. zopfii* u 22 uzorka mleka. Patohistološkim ispitivanjem tkiva mlečne žlezde su utvrdili promene karakteristične za mastitise izazvane ovim algama. U 19 slučajeva mastitisi izazvani *P. zopfii* su bili hroničnog toka. Rezultati dobijeni u našim ispitivanjima su usaglasnosti sa napred navedenim rezultatima. Mastitisi izazvani algama iz roda *Prototheca* su u najvećem procentu bili hroničnog toka.

Budući da posledica mastitisa izazvanog algama iz roda *Prototheca* može da bude gubitak funkcije četvrti vimena krava i da je terapija često neuspešna potrebno je da se brzo i pouzdano identifikuje uzročnik bolesti. Roesler i saradnici (2001) su ispitivanjem 32 uzorka mleka krava sa mastitisima, primenom ELISA testa dokazali specifična IgA antitela, a PCR tehnikom utvrdili prisustvo *P. zopfii*.

Marques (2015) je razvila pouzdanu i brzu metodu za molekularnu identifikaciju i diferencijaciju između *P. zopfii* i *P. blaschkeae* direktno iz mleka. Metoda je

zasnovana na kreiranju prajmera za ITS ("internal transcribed spacer") sekvencu lociranu na ribozomalnoj DNA *Prototheca* spp. Korišćenjem navedene PCR tehnike, uspešno je identifikovala obe vrste algi.

Da bismo doprineli poznavanju puteva širenja mastitisa izazvanih algama iz roda *Prototheca* izvršili smo genotipizaciju algi iz roda *Prototheca* izolovanih iz uzoraka mleka uzetih iz četvrti vimena krava u slučajevima mastitisa. Primenom PCR tehnike 37 (94,8%) izolata je identifikovano kao *Prototheca zopfii* genotip 2, a samo dva odnosno (5,2%) izolata su identifikovana kao *Prototheca zopfii* genotip 1. Rezultati naših istraživanja slažu sa nalazima drugih istraživača da mastitise krava najčešće izaziva *Prototheca zopfii* genotip 2. Onozaki i sar. (2013) su iz 140 uzoraka mleka krava sa mastitisom u 135 uzoraka su izolovali alge iz roda *Prototheca*. Primenom PCR tehnike izolate su identifikovali kao *P. zopfii* genotip 2.

Primenom PCR tehnike i analize polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata - RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Aouay i sar. (2008) su od 30 izolata *P. zopfii*, poreklom iz uzoraka mleka krava uzetih u slučaju mastitisa, kao *P. zopfii* genotip 2 identifikovali 27 izolata, a kao *P. zopfii* genotip 3 identifikovali su 3 izolata.

## **6.2 Oseljivost izolata *Prototheca zopfii* na odabrane antibiotike i antimikotike**

Prema podacima iz literature alge iz roda *Prototheca* nisu osetljive na većinu antibiotika i antimikotika koji se koriste u terapiji supkliničkih i kliničkih mastitisa. Rezultati dobijeni u našim istraživanjima se slažu sa rezultatima dobijenim u drugim istraživanjima.

Wawron i saranici (2013) su utvrdili da su svi izolati (27), algi iz roda *Prototheca*, bili rezistentni na klotrimazol, flukonazol, ekonazol, flucitozin, cefoperazon, cefaleksin, enrofloksacin, linkomicin i oksitetraciklin. Rezultati dobijeni u našim istraživanjima u kojima smo utvrdili 100% rezistenciju na mikonazol, griseofulvin, ceftazidim i oksitetraciklin, osetljivost na nistatin kod 25 (64,1%), intermedijarnu osetljivost kod 6 (15,4%) i rezistenciju kod 8 (20,5%)

izolata se slažu rezultatima napred navedenih autora. Za razliku od rezultata dobijenih u našim istraživanjima Lassa (2007) je utvrdio da je 90% izolata bilo rezistentno na mikonazol, a osetljivo na nistatin 80% i amfotericin B 20% izolata.

Nijedan izolat *P. zopfii*, u našim istraživanjima, nije bio osetljiv na ketokonazol, intermedijarno je bilo osetljivo 5 (12,8%) izolata, a 34 (87,2%) izolata je bilo rezistentno. Za raliiku od rezultata dobijenih u našim istraživanjima Wawron i sar. (2013) su utvrdili osetljivost na ketokonazol kod 14 (51,9%) izolata, intermedijarnu osetljivost kod 6 (22,2%) izolata, a rezistenciju kod 7 (25,9%) izolata, a Lopes i saradnici (2008) su utvrdili osetljivost na ketokonazol kod 77,8% i amfotericin B 11,1% izolata.

Rezultati dobijeni u našim istraživanjima, ispitivanjem osetljivosti na amfotericin B, u kojima smo utvrdili intermedijarnu osetljivost kod 16 (41,0%) i rezistenciju kod 23 (59,0%) izolata se slažu rezultatima Wawron i saradnika (2013) koji su utvrdili intermedijarnu osetljivost kod 13 (48,1%) izolata, a rezistenciju kod 14 (51,9%) izolata.

Milanov i saradnici (2006) su ispitali osetljivost izolata *Prototheca* spp. *in vitro* na antifungalne agense i utvrdili osetljivost na nistatin i amfotericin B. U našem radu 6 (23,1%) uzoraka je bilo osetljivo na kanamicin, 7 (17,9%) uzoraka je bilo intermedijarno osetljivo i 23 (59,0%) je bilo rezistentno.

Najveću osetljivost izolata *P. zopfii* od šest ispitivanih antibiotika smo utvrdili na streptomycin 16 (41,0%), zatim intermecijarnu osetljivost kod 10 (25,6%) izolata, i rezistenciju kod 13 (33,4%) izolata. Za razliku od rezultata dobijenih u našim strażivanjima Lopes i saradnici (2008) su rezistenciju na streptomycin utvrdili kod svih izolata.

Ispitivanjem rezistencije na gentamicin utvrđeno je da je najveći broj izolata bio rezistentan 37 (94,9%), a samo dva (5,1%) izolata je bilo osetljivo na ovaj antibiotik. Ovi naši rezultati se razlikuju od rezultata Wawron i saradnika (2013) koji su utvrdili da je najveći broj izolata *P. zopfii* bio osetljiv na gentamicin 26 (96,3%) i kanamicin 25 (92,6%) .

Milanov i sar. 2006 su ispitali osetljivost izolata *Prototheca* spp. *in vitro* na antibiotske i utvrđena umerena osetljivost na polimiksin B, gentamicin i

neomicin, ali i rezistencija na kanamicin, enrofloksacin, ceftriakson, streptomycin, amoksicilin, tetraciklin, penicilin, linkomicin i novobiocin.

Jagielski i saradnici su (2012) odredili minimalnu inhibitornu koncentraciju (MIC) većeg broja antimikotika za alge iz roda *Prototheca*. Najnižu minimalnu inhibitornu koncentraciju su utvrdili za amfotericina B koja je za 97% izolata bila ispod 2 mg/L. Na osnovu rezultata ispitivanja autori su zaključili da je amfotericin B preparat izbora za lečenje mastitisa izazvanog algama iz roda *Prototheca*. Za razliku od Jagielski i saradnika (2012) Marques i sar., (2006) su utvrdili visoku efikasnost nistatina (MIC 1,953) prema izolatima *P. zopfii* i *P. wickerhamii*.

Na osnovu rezultata naših ispitivanja i podataka iz literature u terapiji mastitisa izazvanih algama iz roda *Prototheca* mogu se preporučiti nistatin i aminoglikozidni preparati.

## 7. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobijenih tokom izrade disertacije mogu se izvesti sledeći zaključci.

1. Od ukupno 494 uzoraka mleka, uzetih iz četvrti vimena krava sa pet farmi u Republici Srbiji, alga *P. zopfii* je izolovana iz 39 uzoraka, od kojih su 32 uzorka bila poreklom od krava sa supkliničkim mastitisima, a 7 uzoraka od krava sa kliničkim mastitisom.
2. Prosečan broj somatskih ćelija je bio povećan u uzorcima mleka, uzetim iz četvrti vimena krava sa supkliničkim mastitisom, poreklom sa farmi na kojima je izolovana alga *P. zopfii*.
3. *Prototheca* spp. je najčešće izolovana iz uzoraka mleka uzetih iz četvrti vimena krava na farmi B iz 17 (43%) uzoraka, zatim na farmi C iz 12 (31%) uzoraka i farmi D iz 10 (26%) uzoraka. Iz uzoraka mleka uzetih iz četvrti vimena krava poreklom sa farmi A i E nisu izolovane alge iz roda *Prototheca*.
4. Primenom mikrobioloških metoda i PCR tehnike je izolovano i identifikovano 39 izolata *Prototheca* spp. Najveći broj izolata *Prototheca* spp. 37 (94,87%) je identifikovan kao *Prototheca zopfii* genotip 2, a samo dva izolata (5,13%) su identifikovana kao *Prototheca zopfii* genotip 1.
5. *Prototheca* spp. nije izolovana iz uzoraka vode za napajanje krava i briseva uzetih sa podova štala, opreme za mužu i pojilica.
6. Svi izolati oba genotipa su bili rezistentni na antibiotike oksitetraciklin i ceftazidim, i antimikotike mikonazol i griseofulvin.
7. Ukupno 25 (64,11%) izolata *P. zopfii* je bilo osetljivo na nistatin, 16 (41,03%) izolata na streptomycin, 9 (23,07%) na kanamicin i 6 (15,38%) na gentamicin, na osnovu čega se nistatin i aminoglikozidni preparati mogu preporučiti u terapiji prototekalnog mastitisa u Republici Srbiji.

## 8. LITERATURA

1. Ahrholdt J, Roesler U (2011) Genotypical differentiation of *P. rototheca* isolates of milk samples from mastitis affected cattle in Germany. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 124, 10–15.
2. Ahrholdt J, Murugaiyan J, Staubinger RK, Jagielski T, Roesler U (2012) Epidemiological analysis of worldwide bovine, canine and human clinical *Prototheca* isolates by PCR genotyping and MALDI-TOF mass spectrometry proteomic phenotyping. *Med Mycol* 50, 234-243.
3. Alnakip ME, Quintela-Baluja M, Böhme K, Fernández-No I, Caamaño-Antelo S, Calo-Mata P Barros-Velázquez J (2014) The immunology of mammary gland of dairy ruminants between healthy and inflammatory conditions. *Journal of Veterinary Medicine* 2014, Article ID 659801, 1-31, doi:10.1155/2014/659801.
4. Aouay A, Coppee F, Cloet S, Cuvelier P, Belayew A, Lagneau PE, Mullender C (2008), Molecular characterization of *Prototheca* strains isolated from bovine mastitis, *JMycol Med*, 18, 224-227.
5. Auldred MJ, Hubble IB, 1998, Effects of mastitis on raw milk and dairy products, *Aust. J. Dairy Tech*, 53. 28-36.
6. Baumgärtner B (1997) Vorkommen und Bekämpfung der Protothekenmastitis des Rindes im Einzugsgebiet des Staatlichen Veterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamtes. *Potsdam Prakt Tierarzt* 78, 406-414.
7. Bexiga R, Cavaco L, Vilela CL (2003) Isolation of *Prototheca zopfii* from bovine milk. *Rev Port Ciênc Vet* 98, 33–37.

8. Bergmann A (1993) Experimental *Prototheca* mastitis in cattle and therapy with tetramisole hydrochloride.[Article in German] *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 106, 8, 257-60.
9. Bergmann, A (1987) Inhibitory effects of levamisole and tetramisole hydrochloride (*invitro*) on *Prototheca zopfii* and *Candida albicans*. *Monatshefte-fur-Veterinamedizin*, 42, 599-602.
10. Brito MAVP, Veiga VMO, Paiva-Brito MA, Oliveira-Veiga VM (1997) Clinical bovine mastitis caused by *Prototheca zopfii*, a case study. *Ciencia Rural*, 24, 681-4.
11. Bouari C(CUC)., Câtoi C., Fit N., Râpunțean S., Bolfă P., Taulescu M., Gal A., Tâbâran F, Nagy A, Borza G, Moussa R, Nadăș G (2011) *In vitro* Susceptibility of *Prototheca* Species to Antifungal Agents. *Bulletin UASVM Veterinary Medicine.* 68, 1, 92-96.
12. Boboš S, Vidić B (2005) Mlečna žlezda preživara (morfologija, patologija, terapija). Mala knjiga, Novi Sad.
13. Bueno VF, de Mesquita AJ, Neves RB, de Souza MA, Ribeiro AR, Nicolau ES, de Oliveira AN (2006) Epidemiological and clinical aspects of the first outbreak of bovine mastitis caused by *Prototheca zopfii* in Goiás State, Brazil. *Mycopathologia* 161, 141–145.
14. Buzzini P, Turchetti B, Facelli R, Baudino R, Cavarero F, Mattalia L, Mosso P, Martini A (2004) First large-scale isolation of *Prototheca zopfii* from milk produced by dairy herds in Italy. *Mycopathologia* 158, 427–430.
15. Buzzini P, Turchetti B, Branda E, Goretti M, Amici M, Lagneau PE, Scaccabarozzi L, Bronzo V, Moroni P (2008) Large-scale screening of the



in vitro susceptibility of *Prototheca zopfii* towards polyene antibiotics. *Med Mycol* 46, 511–514.

16. Burrenich CJ, Detilleux, Paape AM, Massart-Lee.(2000): Physiological and genetic factors that influence the cow resistance to mastitis, especially during early lactation. *Symposium on Immunology of Ruminant mammary Gland*. Proceedings, 9-20.
17. Capra E, Cremonesi P, Cortimiglia C, Bignoli G, Ricchi M, Moroni P, Pesce A, Luini M, Castiglioni B (2014) Simultaneous identification by multiplex PCR of major *Prototheca* spp. isolated from bovine and buffalo intramammary infection and bulk tank. *Lett Appl Microbiol* 59, 642–647.
18. Clempson AM, Pollott GE, Brickell JS, Bourne NE, Munce N, Wathes DC (2011) Evidence that leptin genotype is associated with fertility, growth, and milk production in Holstein cows. *J Dairy Sci* 94, 3618-3628.
19. Chaffer M, Leitner G, Winkler M, Glickman A, Krifucks O, Ezra E, Saran A (2000), Coulasa-negative staphylococci and mammary gland inflammation in cows. *Simposium on Immunology og Ruminant mammary Gland Proceedings*, 331-37.
20. Concha (1986): Cell types and their immunological functions in bovine mammary tissues and secretion- a review of the literature. *Nord. Vet. Med.*38
21. Costa EO, Carciofi AC, Melville PA, Prada MS, Schalch U (1996) *Prototheca* spp. outbreak of bovine mastitis. *Zentralbl Veterinarmed B* 43, 321–324.
22. Costa EO, Melville PA, Ribeiro AR, Watanabe ET, Parolari MC (1997) Epidemiologic study of environmental sources in a *Prototheca zopfii* outbreak of bovine mastitis. *Mycopathologia* 137, 33–36.

23. Costa EO, Ribeiro AR , Watanabe ET, Melville PA (1998) Infectious bovine mastitis caused by environmental organisms. *Zentralblatt für Veterinärmedizin B*, 45, 65-71.
24. Cunha LT, Pugine SM., Silva MR., Costa EJ., DE Melo MP (2010) Microbicidal action of indol-3-acetic acid combined with horseradish peroxidase on *Prototheca zopfii* from bovine mastitis. *Mycopathologia*, 169,99-105.
25. Cvetojević Đ, Kureljušić B, Savić B, Radanović O, Jezdimirović N, Jakić-Dimić D, Krnjajić S, Bursać D, Pavlović K (2015) Mastitis goveda prouzrokovan algom *Prototheca zopfii*. Zbornik predavanja VI Naučnog simpozijuma "Reprodukcija domaćih životinja i bolesti mlečne žlezde", 8-11. okt. 2015, Divčibare, Srbija, str. 161-162.
26. Da Costa E., Ribeiro MG, Ribeiro AR, Rocha NS, de Nardi Junior G (2004) Diagnosis of clinical bovine mastitis by fine needle aspiration followed by staining and scanning electron microscopy in a *Prototheca zopfii* outbreak. *Mycopathologia*. 158, 81, 85.
27. De Haas Y, Barkema HW, Veerkamp RF (2002) Genetic parameters of pathogen-specific incidence of clinical mastitis in dairy cows. *Anim Sci* 74, 233–242.
28. De Vliegher S, Fox LK, Piepers S, McDougall S, Barkema HW (2012) Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *J Dairy Sci* 95 (3) 1025-1040.
29. Dekkers JCM (2004) Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons. *J Anim Sci* 82 (E-Suppl.) E313-E328.

30. DiPersio JR. (2001): *Prototheca* and protothecosis. *Clinical Microbiology Newsletter*. 23, 115-120.
31. Dillberger JE, Homer B, Daubert D, Altman NH (1988) Protothecosis in two cats. *J Am Vet Med Assoc* 192 (11) 1557-1559.
32. Espinel-Ingroff A, Stockman L, Roberts G, Pincus D, Pollack J, Marler J (1998) comparison of RapID yeast plus system with API 20C system for identification of common, new, and emerging yeast pathogens. *Journal of Clinical Microbiology*. 36, 883-886.
33. El-Zaatari M, Pasarell L, McGinnis MR, Buckner J, Land GA, Salkin IF (1990) Evaluation of the updated Vitek yeast identification data base. *Journal of Clinical Microbiology*. 28, 1938-1941.
34. Frerking H, (1961), Yur Feststellung von Enterstörungen und Enterentzündungen in Vorzugsmilchbetrieben unter Verwendung geeigneter Laboratoriumsverfahren. Vet. Med. Diss. Hanover.
35. Gao J, Hou RG, Zhang HQ, He JZ, Li SM, Su JL, Han B. (2011), A novel DNA extraction and duplex polymerase chain reaction assay for the rapid detection of *Prototheca zopfii* genotype 2 in milk. *Lett Appl Microbiol*. 53(3):278-82.
36. Gao J, Zhang HQ, He JZ, He YH, Li SM, Hou RG, Wu QX, Gao Y, Han B (2012) Characterization of *Prototheca zopfii* associated with outbreak of bovine clinical mastitis in herd of Beijing, China. *Mycopathologia* 173 (4) 275-281.
37. Glantz M, Lindmark Månsson H, Stålhammar H, Paulsson M (2012) Effect of polymorphisms in the leptin, leptin receptor and acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) genes and genetic

polymorphism of milk proteins on bovine milk composition. *J Dairy Res* 79, 110-118.

38. Grzesiak B, Głowacka A, Krukowski H, Lisowski A, Lassa H, Sienkiewicz M (2016) The in vitro efficacy of essential oils and antifungal drugs against *Prototheca zopfii*. *Mycopathologia* 1-7, doi: 10.1007/s11046-016-9994-6.
39. Gonçalves JL, Lee SHI, de Paula Arruda E, Galles DP, Caetano VC, de Oliveira CAF, Fernandes AM dos Santos MV (2015) Biofilm-producing ability and efficiency of sanitizing agents against *Prototheca zopfii* isolates from bovine subclinical mastitis. *J Dairy Sci* 98 (6) 3613-3621.
40. Harmon R. (1980) Neutrophil leukocyte as a source of lactoferrin in bovine milk. *Am. J. Vet. Res.* 41, 1603-06.
41. Harmon RJ, Clark T, Ramesh T, Crist WL, Langiois BE, Akers K, Smith B (1992) Environmental pathogen numbers in pastures and bedding of dairy cattle, *Journal of Dairy science*, 75, 256.
42. Harmon RJ (1994) Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J Dairy Sci* 77 (7) 2103–2112.
43. Hancock JT, Salisbury V, Ovejero-Boglione MC, Cherry R, Hoare C, Eisenthal R et.al. (2002) Antimicrobial properties of milk: dependence on presence of xanthine oxidase and nitrite, *Antimicrob Agents Chemother*, 46, 3308-3310.
44. Hollingsworth SR (2000) Canine Protothecosis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 30 (5) 1091-1101.

45. Jánosi S, Ratz F, Szigeti G, Kulcsar M, Kerényi J, Laukó T, Katona F, Huszenicza G (2001) Pathophysiology: Review of the microbiological, pathological, and clinical aspects of bovine mastitis caused by the alga *Prototheca zopfii*. *Vet Quart* 23 (2) 58-61.
46. Jagielski T, Lagneau PE (2007) Protothecosis. A pseudofungal infection. *J Mycol Med* 17: 261–270.
47. Jagielski T, Lassa H, Ahrhold J, Malinowski E, Roesler U (2011) Genotyping of bovine *Prototheca* mastitis isolates from Poland. *Vet Microbiol* 149 (1-2) 283-287.
48. Jagielski T, Buzzini P, Lassa H, Malinowski E, Branda E, Turchetti B, Polleichtner A, Roesler U, Lagneau P, Marques S, Silva E, Thompson G, Stachowiak R, Bielecki J, (2012), Multicentre Etest evaluation of *in vitro* activity of conventional antifungal drugs against European bovine mastitis *Prototheca* spp. Isolates. *J Antimicrob Chemother*, 67, 1945-1947.
49. Jensen HE, Aalbaek B, Bloch B, Huda A (1998) Bovine mammary protothecosis due to *Prototheca zopfii*. *Med Mycol* 36, 89–95.
50. Ishikawa H, Shimizu T (1983) Depression of B-lymphocytes by mastitis and treatment with levamisole. *J Dairy Sci*. 66, 3, 556-61.
51. Kaminski ZC, Kapila R, Sharer LR, Kloster P, Kaufman L (1992) Meningitis due to *Prototheca wickerhamii* in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis* 15, 704–706.
52. Kaplan W, Chandler FW, Holzinger EA, Plue RE, Dickinson RO (1976) Protothecosis in a cat: first recorded case. *Sabouraudia* 14 (3) 281-286.

53. Katić V (2010) Preventiva mastitisa. Zbornik radova Naučnog simpozijuma „Oboljenja mlečne žlezde“, 14-17. okt. 2010, Divčibare, Srbija, str. 69-79.
54. Kawai K, Shimazaki K., Higuchi H., Nagahata H (2007) Antibacterial activity of bovine lactoferin hydrolysate against mastitis pathogens and its effect on superoxide production of bovine neutrophils. *Zoonoses Public Health*, 54, 160-164.
55. Kishimoto Y, Kano R, Maruyama H, Onozaki M, Makimura K, Ito T, Matsubara K, Hasegawa A, Kamata H (2010) 26S rDNA-based phylogenetic investigation of Japanese cattle-associated *Prototheca zopfii* isolates. *J Vet Med Sci* 72 (1) 123–126.
56. Krcméry V, Jr (2000) Systemic chlorellosis, an emerging infection in humans caused by algae. *Int J Antimicrob Ag* 15, 235–237.
57. Krukowski H, Lisowski A, Nowakowicz-Debek B, Wlazlo L (2013), Susceptibility of *Prototheca zopfii* strains isolated from cows with mastitis to chlorhexidine and iodine. *Turk J Vet Anim Sci*, 37 (1) 106-108.
58. Korhonen H, Kaartinen L, 1995, Changes in the composition of milk induced by mastitis, The bovine udder and mastitis, University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine, 77-82.
59. Lass-Flörl C, Mayr A (2007) Human protothecosis. *Clin Microbiol Rev* 20, 230-242.
60. Lassa H, Malinowski E (2007) Resistance of Yeast and algae isolated from cow mastitis milk to antimicrobial agents. *Bull Vet Inst Pulawy*, 51, 575-578.

61. Lassa H, Jagielski T, Malinowski E (2011) Effect of different heat treatments and disinfectants on the survival of *Prototheca zopfii*. *Mycopathologia*. 2011 171, 3, 177-82.
62. Le Roux A, Gumber S, Bauer RW, Rademacher N, Gaschen L (2013) Algal meningoencephalitis due to *Prototheca* spp. in a dog. *Case Reports in Veterinary Medicine* 2013, Article ID 474731, 1-5, doi:10.1155/2013/474731
63. Legrand D, Ellass E, Pierce A, Mazurier J. (2004) Lactoferrin and host defence: on overview of its immune-modulating and anti-inflammatory properties, *Biometals*, 17, 225-229.
64. Lerche M (1952) Mastitis in a cow caused by an algae (*Prototheca*). *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 4, 64–69 [in German].
65. Lee C, Wooding FBP, Kemp P, (1980) Identification, properties, and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry cow secretions, colostrum and milk from normal cows. *J. Dairy Res.* 47, 39-50.
66. Lee NY., Kawai K., Makamura I., Tanaka T., Kumura H., Shimazaki K (2004) Susceptibilities against bovine lactoferrin with microorganisms isolated from mastitic milk. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 66, 1267-1269.
67. Leimann BC, Monteiro PC, Lazera M, Candanoza ER, Wanke B (2004) Protothecosis. *Medical Mycology*. 42, 95-106.

68. Lopes MM, Ribeiro R, Carvalho D, Freitas G (2008) *In vitro* antimicrobial susceptibility of *Prototheca* spp. isolated from bovine mastitis in a Portugal dairy herd. *J Mycol Med* 18, 205–209.
69. Lu S, Xi L, Qin W, Luo Y, Lu C, Li X (2012) Cutaneous protothecosis: two new cases in China and literature review. *Int J Dermatol* 51 (3) 328-331.
70. Malinowski E, Lassa H, Klossowska A (2002) Isolation of *Prototheca zopfii* from inflamed secretion of udder. *Bull Vet Inst Pulawy* 46, 295-299.
71. Marques S, Silva E, Carvalheria J, Thompson G (2006) *In vitro* antimicrobial susceptibility of *Prototheca wickerhamii* and *Prototheca zopfii* isolated from bovine mastitis. *J Dairy Sci* 89, 4202–4204.
72. Marques S, Silva E, Kraft C, Carvalheira J, Videira A, Huss VA, Thompson G (2008) Bovine mastitis associated with *Prototheca blaschkeae*. *J Clin Microbiol* 46 (6) 1941-1945.
73. Marques S, Silva E, Carvalheira J, Thompson G (2010) Phenotypic characterization of mastitic *Prototheca* spp. isolates. *Res Vet Sci* 89 (1) 5-9.
74. Marques S (2010a) Protothecosis: Agent characterization and pathogenesis. Tese de doutoramento em Ciências Veterinárias (PhD thesis). Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto (Portugal), pp. 1-218.
75. Marques S., Silva E., Carvalheira J., Thompson G (2010b) Short communication: Temperature sensibility of *Prototheca blaschkeae* strains isolated from bovine mastitis milk, *Journal of Dairy Science*, 93, 5110-5113.



76. Marques S, Huss VAR, Pfisterer K, Grosse C, Thompson G (2015) Internal transcribed spacer sequence-based rapid molecular identification of *Prototheca zopfii* and *Prototheca blaschkeae* directly from milk of infected cows. *J Dairy Sci*, 98 (5) 3001-3009.
77. Melville PA, Benites NR, Sinhorini IL, Costa EO (2002) Susceptibility and features of the ultrastructure of *Prototheca zopfii* following exposure to copper sulphate, silver nitrate and chlorhexidine. *Mycopathologia*, 156, 1-7.
78. McDonald JS, Richard JL, Anderson AJ (1984) Antimicrobial susceptibility of *Prototheca zopfii* isolated from bovine intramammary infections. *Am J Vet Res* 45, 1079-1080
79. Min Z, Moser SA, Pappas PG (2013) *Prototheca wickerhamii* algemia presenting as cholestatic hepatitis in a patient with systemic lupus erythematosus: A case report and literature review. *Medical Mycology Case Reports* 2, 19-22.
80. Milanov D, Stojanović D (2010) O uzročnicima mastitisa krava. *Zbornik radova Naučnog simpozijuma „Oboljenja mlečne žlezde“*, 14-17. okt. 2010, Divčibare, Srbija, str. 93-101.
81. Milanov D, Suvajdžić Lj, Pušić I, Vidić B, Đorđević Milić V (2006) Outbreak of endemic form of protothecal mastitis on a dairy farm. *Acta Vet-Belgrade* 56 (2-3) 259-265.
82. Mihajlović B. (1983): Mikrobiologija I. Veterinarski fakultet.
83. Möller A, Truyen U, Roesler U (2007) *Prototheca zopfii* genotype 2-the causative agent of bovine protothecal mastitis? *Vet Microbiol* 120, 370-374.

84. Mrode RA, Swanson GJT (1996): Genetic and statistical properties of somatic cell counts and its suitability as an indirect means of reducing the incidence of mastitis in dairy cattle. *Animal Breeding Abstracts*, 64, 847.
85. Mc Donald JS, Anderson AJ (1981): Total and differential somatic cell counts in secretion from noninfected bovine mammary glands: the periparturient period. *Am. J. Vet. Res.* 42:1366-8.
86. Nguyen QGL, Rosen T (2015) Cutaneous protothecosis in a patient with chronic lymphocytic leukemia: A case report and literature review. *Journal of Fungi* 1 (1) 4-12.
87. Nielsen C (2009) Economic impact of mastitis in dairy cows. Doctoral Thesis. Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Department of Animal Breeding and Genetics, Swedish University of Agricultural Sciences (SLU), Uppsala, Sweden, 2009.
88. Nickerson S.C. (1985): Immune mechanisms of the bovine udder an overview. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* Jul.1. 187 (1), 41-45.
89. O'Brien B, Fitzpatrick C, Meaney WJ, Jozce P (1999): Relationship between somatic cell count and neutrophils in milk. *Ir. J. agr. Food Res.* 38, 288.
90. Ogorevc J, Kunej T, Razpet A, Dovc P (2009) Database of cattle candidate genes and genetic markers for milk production and mastitis. *Anim Genet* 40, 832-857.
91. Onozaki M, Makimura K, Satoh K, Hasegawa A (2013), Detection and Identification of Genotypes of *Prototheca zopfii* in Clinical Samples by Quantitative PCR Analysis, *Jpn J Infect Dis*, 66, 383-390.

92. Osumi T, Kishimoto Y, Kano R (2008) *Prototheca zopfii* genotypes isolated from cow barns and bovine mastitis in Japan. *Vet Microbiol* 131, 419 – 423.
93. Pankey JW et al. (1984): Uptake of postmilking teat antisepsis. *J. Dairy Sci.* 67, 1336-1353.
94. Padhye AA, Baker JG, D'Amato RF (1979) Rapid identification of *Prototheca* species by the API 20C system. *Journal of Clinical Microbiology.* 10, 579-582.
95. Pillai SR, Kunze E, Sordillo LM, Jayarao BM (2001) Application of differential inflammatory cell count as a tool to monitor udder health. *J.Dairy Sci.* 84,1313-1420.
96. Pore RS, Shahan TA, Pore MD, Blauwiel R (1987) Occurrence of *Prototheca zopfii*, a mastitis pathogen, in milk. *Vet Microbiol* 15, 315–323.
97. Raab W, (1990) Skin cleansing in health and disease. *Wien. Med. Wochenschr.* 17 (suppl.108), 4.
98. Reinard JHD (1983) Experimental mastitis with *Escherichia coli*: kinetics of bacteriostatic and bactericidal activities. *Ann. Rech. Vet.* 14, 1-11.
99. Rainrad P, Poutrel B. (1995) Deposition of complement component on *Streptococcus agalactiae* in bovine milk in the absence in inflammation. *Infect. Immun.* 63, 3422-27.
100. Ricchi M, Goretti M, Branda G, Garbarino CA, Turchetti B, Moroni P, Arrigoni n, Buzzini P (2010) Molecular characteriyation of *Prototheca* strains isolated from Italian dairy heras. *J Dairy Sci.* 93, 4625-4631.

101. Roesler U, Hensel A (2003) Longitudinal analysis of *Prototheca zopfii*-specific immune responses: correlation with disease progression and carriage in dairy cows. *J Clin Microbiol* 41 (3) 1181–1186.
102. Roesler U, Scholz H, Hensel A (2001) Immunodiagnostic identification of dairy cows infected with *Prototheca zopfii* at various clinical stages and discrimination between infected and uninfected cows. *J Clin Microbiol* 39, 539-543.
103. Roesler U, Scholz H, Hensel A (2003) Emended phenotypic characterization of *Prototheca zopfii*: a proposal for three biotypes and standards for their identification. *Int J Syst Evol Microbiol* 53, 1195–1199.
104. Roesler U, Moeller A, Hensel A, Baumann D, Truyen U (2006) Diversity within the current algal species *Prototheca zopfii*, a proposal for two *Prototheca zopfii* genotypes and description of a novel species, *Prototheca blaschkeae* spp nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 1419-1425.
105. Rodrigues E (2003): *Prototheca* infections. Harvard Wide Conference.
106. Royster E, Wagner S (2015) Treatment of mastitis in cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 31 (1) 17-46.
107. Saad AM, Concha C, Astrom G (1989): Alterations in neutrophil phagocytosis and lymphocyte blastogenesis in dairy cows around parturition. *Zentr. Vet. Med.* B 36, 337-45.
108. Sanchez L, Aranda P, Perez MD, Calvo M. (1988) Concentration of lactoferrin and transferrin throughout lactation in cows colostrums and milk. *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, 369, 1005-1008.

109. Salerno T, Ribeiro MG, Langoni H, Siqueira AK, Costa EO, Melville PA (2010) *In vitro* algacideeffect of sodiun hypochlorite and iodine based antiseptics on *Prototheca zopfii* strains isolated from bovine mikl. *Research in Veterinary Science*. 88, 211-213.
110. Satoh K, Ooe K, Nagayama H, Makimura K (2010) *Prototheca cutis* sp. nov., a newly discovered pathogen of protothecosis isolated from inflamed human skin. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 1236–1240.
111. Sapieryński R, Jaworska O (2008) Protothecosis as a cause of chronic diarrhoea in a dog. *Pol J Vet Sci* 11 (3) 225-229.
112. Shank AM, Dubielzig RD, Teixeira LB (2015) Canine ocular protothecosis: A review of 14 cases. *Vet Ophthalmol* 18 (5) 437-442.
113. Singh U, Kumar S, Deb R, Mann A, Sharma A (2013) Genotypic profiling of coding region of leptin gene and their association studies on reproductive and milk production traits in Sahiwal and Frieswal cattle of India. *Afr J Biotechnol* 12, 6140-6146.
114. Singh U, Deb R, Alyethodi RR, Alex R, Kumar S, Chakraborty S, Dhama K, Sharma A (2014) Molecular markers and their applications in cattle genetic research: A review. *Biomarkers and Genomic Medicine*, 6, 49–58.
115. Smith KL, Hogan JS (1993) Enviromental mastitis. *Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practis*, 9, 489-498.
116. Sobukawa H, Kano R, Ito T, Onozaki M, Makimura K, Hasegawa A, Kamata H (2011) *In vitro* susceptibility of *Prototheca zopfii* genotypes 1 and 2. *Med Mycol* 49 (2) 222-224.

117. Spalton DE (1985) Bovine mastitis caused by *Prototheca zopfii*: A case study. *Vet Rec* 116, 347 – 349
118. Stenner VJ, MacKay B, King T, Barrs VRD, Irwin P, Abraham L, Swift N, Langer N, Bernays M, Hampson E, Martin P, Krockenberger MB, Bosward K, Latter M, Malik R (2007) Protothecosis in 17 Australian dogs and a review of the canine literature. *Med Mycol* 45 (3) 249-266.
119. Stojić V. (1999) Fiziologija. Naučna knjiga, Beograd.
120. Schalm OW. (1971): Bovine mastitis. Philadelphia, USA
121. Tizard RI. (1996) Veterinary Immunology. ISBN0-7216-5772-9.
122. Tortorano AM, Prigitano A, Dho G, Piccinini R, Dapra V, Viviani MA (2008) *In vitro* activity of conventional antifungal drugs and natural essences against the yeast-like algae *Prototheca*. *J Antimicrob Chemother* 61 (6) 1312–1314.
123. Tsuji H, Kano R, Hirai A, Murakami M, Yanai T, Namihira Y, Chiba J, Hasegawa A (2006) An isolate of *Prototheca wickerhamii* from systemic canine protothecosis. *Vet Microbiol* 118 (3) 305-311.
124. Thompson G, Silva E, Marques S, Müller A, Carvalheira J (2009) Algaemia in a dairy cow by *Prototheca blaschkeae*. *Med Mycol* 47 (5) 527-531.
125. Thiele D, Bergmann A, (2002) Protothecosis in human medicine. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 204, 297-302.

126. Turchetti B., Pinelli P., Buzzini P., Romani A., Heimler D., Franconi F., Martini A (2005) In vitro antimycotic activity of some plant extracts towards yeast and yeast-like strains. *Phytotherapy Research*, 19, 44-49.
127. Ueno R, Urano N, Suzuki M, Kimura S (2002), Isolation characterisation and fermentative pattern of a novel thermotolerant *Prototheca zopfii* var. *hydrocarborea* strain producing ethanol and CO<sub>2</sub> from glucose at 40°C. *Archives of Microbiology*. 177, 244-250.
128. Vakanjac S, Trailović S, Magaš V, Maletić M, Đurić M, Nedić S, Stanišić Lj (2015) Razlozi neuspjeha različitih antibiotskih tretmana mastitisa krava. Zbornik predavanja VI Naučnog simpozijuma "Reprodukcija domaćih životinja i bolesti mlečne žlezde", 8-11. okt. 2015, Divčibare, Srbija, str. 127-134.
129. Vince AR, Pinard C, Ogilvie AT, Tan EO, Abrams-Ogg AC (2014) Protothecosis in a dog. *Can Vet J* 55 (10) 950-954.
130. Wawron W, Bochniarz M, Piech T, Wysocki J, Kocik M (2013) Antimicrobial susceptibility of *Prototheca zopfii* isolated from bovine mastitis. *B Vet I Pulawy* 57 (4) 485–488.
131. Wilton JW, Van Vleck LD, Evertt RW, Guthrie RS, Roberts SJ (1972): Genetic and environmental aspects of udder infections, *J. Dairy Sci*, 55, 183-93.
132. Vigna M, Alberguina J, Monaco SM, Galvagno M, (2002) *Prototheca zopfii* (Chlorophyta) capaz de utilizar "gas oil", registrada por primeira vez en aguas contaminadas de Argentina. *Darwiniana*. 40, 45-50
133. Zaini F, Kanani A, Falahati M, Fateh R, Salimi-Asl M, Saemi M, Saemi N, Farahyar Sh, Kheirabad AK, Nazeri M (2012) Identification of *Prototheca zopfii* from bovine mastitis, *Iranium J Publ Health*, 41, 8, 84-88.

## Biografija

Božidar Đukić je rođen u Beogradu 20. 09. 1974. godine. Osnovnu i srednju školu završio je u Zemunu. Fakultet veterinarske medicine je upisao 1993. godine i završio 1999. Iste godine upisuje postdiplomske studije iz patologije i terapije domaćih životinja. Magistarsku tezu pod naslovom „Izolacija i karakterizacija antigena *Toxoplasma gondii* i njihova primena u razvijanju ELISA testa za detekciju specifičnih antitela kod svinja” odbranio je 29.06.2007. godine na FVM u Beogradu i stekao zvanje magistra veterinarskih nauka. Kurs „Nauka o laboratorijskim životinjama“ sertifikovan od strane udruženja FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) je završio 2013. godine. Radio je kao asistent pripravnik na Katedri za radiologiju i radijacionu higijenu Fakulteta veterinarske medicine u Beogradu od 1999 do 2000. Zaposlen je u Institutu za primenu nuklearne energije (INEP) u Zemunu gde je nastavio svoje naučno istraživačko usavršavanje baveći se ispitivanjima u oblasti imunoparazitologije, sa posebnim fokusom na imunogena svojstva komponenti parazita i serodijagnostiku parazitarnih oboljenja od 2000 do 2006. god. Odslužio je vojni rok u Školi Rezervnih Oficira u okviru koga je proveo šest meseci kao stažista na Vojnomedicinskoj Akademiji (VMA) u Beogradu od 2001 do 2002. god. Božidar Đukić je radio na odeljenu za patologiju domaćih životinja Naučnog instituta za veterinarstvo u Beogradu od 2006 do 2007. Zatim je radio kao veterinar na farmi muznih krava „BD AGRO“ u Dobanovcima. Tokom formiranja ove farme učestvovao je u selekciji visoko steonih junica u Kanadi. Bavio se poslovima kliničke i laboratorijske dijagnostike bolesti velikih preživara od 2007 do 2012. Od 2012. zaposlen je u Agenciji za lekove i medicinska sredstva Srbije u biološkoj laboratoriji, Nacionalne kontrolne laboratorije kao stručni saradnik za veterinarski nadzor i biološka ispitivanja lekova *in vivo*.



## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: мр Божидар Ђукић

Број индекса-

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

Молекуларно-генетска карактеризација *Prototheca zopfii* као узрочника маститиса крава у Србији

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 30. 06. 2016.



---

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора мр Божидар Ђукић

Број индекса /

Студијски програм: докторске академске студије

Наслов рада: Молекуларно-генетска карактеризација *Prototheca zopfii* као узрочника маститиса крвава у Србији

Ментор: проф. др Слободанка Вакањац

Ментор: Проф. др Јевросима Стевановић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 30. 06. 2016.



---

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**Молекуларно-генетска карактеризација *Prototheca zopfii* као узрочника маститиса крава у Србији**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.  
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

У Београду, 30. 06. 2016.

Потпис аутора



---