

УНИВЕРЗИТЕТ „Св. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ СКОПЈЕ
ФАКУЛТЕТ ЗА ВЕТЕРИНАРНА МЕДИЦИНА-СКОПЈЕ
ШКОЛА ЗА ДОКТОРСКИ СТУДИИ
ВЕТЕРИНАРНА МЕДИЦИНА

Александар Јаневски ДВМ.

**„ЗАСТАПЕНОСТ НА ПАТОГЕНИ БАКТЕРИИ, НИВНА
АНТИМИКРОБНА ОТПОРНОСТ И ПОТЕНЦИЈАЛНИ РИЗИК ФАКТОРИ ЗА
ПОЈАВАТА НА СУБКЛИНИЧКИОТ МАСТИТИС НА МАЛИТЕ
КРАВАРСКИ ФАРМИ ВО Р. С. МАКЕДОНИЈА”**

- докторска дисертација –

Ментор: проф. д-р Дине Митров

Скопје, 2021

СОДРЖИНА

1. ВОВЕД

2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРА

- 2.1 Анатомија на млечната жлезда
- 2.2 Одбранбен механизам на боската и каналот од боската
- 2.3 Маститис, поделба и начин на инфекција
- 2.4 Застапеност, начин на ширење, патогеност и превентива на најчестите предизвикувачи на субклинички маститис кај молзните крави
 - 2.4.1 *Staphylococcus aureus*
 - 2.4.2 *Streptococcus uberis*
 - 2.4.3 *Coagulasa negativni staphylococci*
 - 2.4.4 *Streptococcus agalactiae*
- 2.5 Број на соматски клетки во млекото
 - 2.5.1 Влијание на инфекцијата на млечната жлезда врз бројот на соматските клетки
 - 2.5.2 Влијание на фазата од лактација, староста и бројот на телења врз бројот на соматските клетки
 - 2.5.3 Влијание на стресот и сезоната врз бројот на соматските клетки во млекото
 - 2.5.4 Нормални варијации во бројот на соматските клетки
 - 2.5.5 Бројот на соматски клетки на ниво на стадо
 - 2.5.6 Влијанието на високиот број на соматски клетки врз количината и квалитетот на млекото
- 2.6 Влијание на хигиената на животните и хиперкератозата на крајот од боската врз бројот на соматските клетки и интрамамарната инфекција
- 2.7 Антимикробна отпорност, значење и застапеност кај предизвикувачите на субклинички маститис

3. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО

4. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

- 4.1 Практики на молзење
- 4.2 Идентификација на молзните крави
- 4.3 Собирање на мострите/ примероците на млеко

4.3.1 Бактериолошка изолација на примероците на млеко и утврдување на позитивните четвртини и крави

4.3.2 Бактериолошка идентификација на бактериските причинители со примена на MALDI-TOF MS.

4.3.3 Утврдување на бројот на соматски клетки во млекото

4.3.4 Класификација на млечните четвртини во однос на БСК и ИМИ

4.4 Утврдување на хигиенската оценка на различни делови од телото, како и степенот на хиперкератоза на каналот од боската на молзните крави

4.5 Утврдување на антимикробната отпорност на причинителите кои се најмногу распространети во различни фарми

4.6 Статистичка анализа

5 РЕЗУЛТАТИ

6 ДИСКУСИЈА

7 ЗАКЛУЧОЦИ

8 СПИСОК НА КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

ЛИСТА НА КРАТЕНКИ

МЖ – млечна жлезда

М/О –микроорганизам

S. aureus – staphylococcus aureus

ИМИ– интрамамарна инфекција

АТП - аденозин трифосфат

Са - калциум

На - натриум

К - калиум

Cl - хлор

КМ– клинички маститис

СМ– субклинички маститис

БСК – број на соматски клетки

КМТ - калифорнија маститис тест

б/а – бактерија

CoNS– coagulasa negativni staphylococci

ЗБИРНО МЛЕКО– примерок на млеко собран од сите четвртини на една крава

МЛЕКО ПО ЧЕТВРТИНА– примерок на млеко земен само од една четвртина

л– литар

мл– милилитар

кл – клетка

цм - центиметар

MRSA – methicillin resistant staphylococcus aureus

АМО – антимикробна отпорност

WHO – world health organization

VRE – vancomycin resistant enterococcus

ч – час

г – година

ИММ– интрамамарна

ИМ- интрамускуларна

CFU – (colony forming units англ.) број на видливи колонии формирани на агарната плоча

1. ВОВЕД

Маститисот се уште претставува најраспространета и најскапа болест кај млечните крави насекаде во светот и е најголема загриженост по благосостојбата на кравите. Маститисот е воспаление на млечната жлезда независно кој е причинителот и се карактеризира со физички, хемиски и бактериолошки промени во млекото, како и патолошки промени на самото жлездено ткиво.

Според клиничката слика маститисот е поделен на: клинички и субклинички маститис. **Клиничкиот маститис** се карактеризира со видливи промени т.е. формирање на партали/згрушоци во млекото, оток и болка на самата млечна жлезда како и можна промена во целокупната здравствена состојба на кравата (*депресија, апатија, хипертермија*). **Субклиничкиот маститис** е дефиниран како воспаление на млечната жлезда без видливи клинички знаци, и тоа е основниот проблем што тој не може да се утврди без употреба на дијагностички тестови.

Субклиничкиот маститис е широко распространет во краварските фарми, каде на еден клинички маститис доаѓаат во просек 15-40 случаи на субклинички маститис. Не дијагностицираните крави со субклинички маститис се потенцијален извор за инфекција на здравите крави и стада. Исходот од субклиничкиот маститис може да биде: **а)** да премине во клиничка форма, **б)** да дојде до само излекување и **в)** да премине во хронична форма на маститис. Хроничниот маститис претставува субклинички маститис со долго траење, со прогресивна индурација на паренхимот и изразито намалена продукција на млеко. Загубите од субклиничкиот маститис се енормни и се должат поради: намалената продукција на млеко, трошоци за лабораториски услуги, ветеринарни услуги и лекови, отфрлање на млекото од крави кои се третирани со антибиотик, како и прерано шкартирање на молзните крави.

До сега се дијагностицирани околу 135 различни бактериски видови како потенцијални предизвикувачи на субклинички маститис, а во многу помал број се изолирани и: квасци, алги, габи, хламидии и вируси. Според нивните карактеристики, најчестите маститис патогените бактерии се поделени на:

*** Заразни /контагиозни (*major ang.*) маститис патогени бактерии и**

*** Околински (*minor ang.*) маститис патогени бактерии.**

Бројот на соматските клетки во млекото од лактофризерот ја покажува застапеноста на маститисот во стадото, како и претставува главен индикатор за квалитетот и хигиенската исправност на млекото. Бројот на соматските клетки е прифатен како интернационален стандард за утврдување на застапеноста и појавата на субклиничкиот маститис на ниво на четвртина, млечна жлезда и стадо. На бројот на соматските клетки влијаат бројни фактори, пред сè од најголемо значење се: предизвикувачите на маститис (микроорганизми, токсини и оштетено ткиво), и во многу помала мера физиолошки-фармаколошки фактори (раса, стадиум од лактација, лекови) и стресни фактори (начин на молзење, транспорт, сместување, промена на исхраната и др.). Субклиничкиот маститис, а индиректно и бројот на соматските клетки е во директна корелација со физички, хемиски и бактериолошки промени во млекото и патолошка трансформација на самиот паренхим на млечната жлезда. Корелацијата помеѓу составот на млекото и бројот на соматските клетки е документирана од многу автори.

Во текот на последните неколку децении примената на конкретни контролни програми за превенција на маститисот резултирало со намалување на застапеноста на интрамамарните инфекции. Но пред се, на инфекциите кои се предизвикани од големите/контагиозните патогени микроорганизми, а се повеќе се зголемува застапеноста на маститис предизвикан од околинските патогени микроорганизми. Инциденцата на маститис предизвикан од околински патогени микроорганизми се покажала како многу потежок облик за контрола, а тоа се должи пред се на изворите на околинските патогени микроорганизми како што се: почва, измет и постелка, сите присутни во системите за сместување на молзните крави, како и постоечката флора на кожата од боската.

Хигиената може да се користи како индикатор за благосостојбата на животното, затоа што лошата хигиена кај кравите е поврзана со зголемена појава на маститис предизвикан од околинските патогени микроорганизми. Одредување на степенот на хигиенската чистота на различни делови од телото до некаде укажува и за хигиенската состојба во самата штала т.е. менаџерските практики. Се смета дека чистотата на млечната жлезда влијае врз квалитетот и типот на бактериите присутни на површината

од боската, додека валканите боски се сметаат како извор на околински бактерии во млекото. Бројот на маститис патогените микроорганизми присутни на крајот од боската се во корелација со појавата на интрамамарна инфекција. Интегритетот на ткивото на крајот од боската околу самиот канал е важен фактор во отпорноста против бактериската колонизација на четвртините знаејќи дека каналот на боската претставува првична бариера во одбрана од маститис патогените микроорганизми. Несоодветното управување со молзењето, како и апаратот за молзење како фактор можат да доведат до промени на крајот од боската (*hyperceratosis*).

Едно од најголемите достигнувања во историјата на медицината несомнено е откривањето на антибиотиците. Соодветната антибиотска терапија е од витално значење во лечењето на бактериските инфекции кај животните и кај човекот, бидејќи го забрзува закрепнувањето на болните животни, ја подобрува благосостојбата на третираните животни како и го спречува/намалува ширењето на инфекцијата на други животни или во случај на зоонозна и на луѓето. Антимикробната отпорност претставува светски проблем како во ветеринарната така и во хуманата медицина. Развојот на антимикробна отпорност кај животните индиректно претставува опасност и за јавното здравје т.е. пренесувањето на антимикробната отпорност е наизменична, и од животни на луѓето и од луѓето на животните. Дополнителна загриженост предизвикуваат заразените животни кога немаат видливи клинички симптоми. Во ветеринарната медицина антимикробните супстанции широко се употребуваат кај животните за терапија, профилакса и метафилакса, како и за унапредување во прирастот каде се даваат антибиотици континуирано во субтерапевски дози. Антибиотскиот третман на клиничкиот и субклиничкиот маститис кај млечните крави е воспоставена компонента во програмите за контрола на маститисот. Загриженоста за јавното здравје е од два аспекта и тоа: внесување на антимикробни остатоци и пренос на резистентни патогени микроорганизми. Ризик за луѓето дополнително постои кога сличен антимикробен препарат се користи и кај животните и кај луѓето, или постои вкрстена отпорност помеѓу антимикробните средства што се користат во хумана и ветеринарна практика. Субклиничкиот маститис пред се смета како проблем затоа што тој не се детектира на време и може континуирано да излачува резистентни бактерии во лактофризерот од каде преку суровите млечни продукти може да се пренесе на луѓето.

Во развиените Европски земји се водат задолжителни контроли за утврдување на застапеноста на субклиничкиот маститис на краварските фарми, идентификација на причинителите, користење на најсовремени контролни мерки во неговата превенцијата, утврдување на ризик фактори кој влијаат врз појавата на субклиничкиот маститис како и употреба на антибиотик само со претходно утврдување на антимикробна осетливост. Во спротивно, Република Северна Македонија сеуште нема такви детални податоци за застапеноста на субклиничкиот маститис и утврдување на неговите причинители, а индиректно и за негова контрола и ерадикација, утврдени ризик фактори како и податоци за антимикробната отпорност на предизвикувачите на субклиничкиот маститис.

2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРА

2.1 Анатомија на млечната жлезда

Деталното познавање на структурата и анатомијата на млечната жлезда (МЖ) кај говедата е неопходна за да се разбере целата постапка на: инфекција, патогенеза, терапија и превентивата од самиот маститис.

Млечната жлезда (**Glandula lactifera, uber, mamma, mastos**) претставува модифицирана потна жлезда, со тубуло-алвеоларна структура и ендокрина функција, која е тесно поврзана со гениталните органи и е секундарна полова карактеристика кај женските животни (1, 2). Таа е сместена на вентралниот дел од абдоменот во ингвиналната и препонската регија (1), која кај високо продуктивните млечни крави кранијално може да се протега близу до самиот папок, а каудално помеѓу самите задни нозе (2). Поради својата поставеност на вентралниот дел од абдоменот и просечната тежина од 25кг на празна МЖ и плус тежината на создаденото млеко може да достигне и до 70кг (3). Затоа МЖ силно е фиксирана со суспензаторен систем кој се состои од: кожа, плиток и длабок латерален суспензорен лигамент и медијален суспензорен лигамент (4, 5). Кожата, како дел од суспензорниот систем формира слабо поврзување помеѓу дорзалната површина на предните четвртини и абдоминалниот сид (2). Кожата на МЖ е тенка, еластична, лесно подвижна, обрасната со нежни влакна во која има потни и лојни жлезди (1, 2). Плиткиот латерален суспензорен лигамент е од фиброзно ткиво и започнува од субкарличните тетиви, се шири по површината на МЖ и ја поврзува кожата со сврзното ткиво (2). Латералниот длабок суспензорен лигамент е од фибро-еластично ткиво кое не дозволува истегнување на МЖ кога таа е полна со млеко (2) и претставува значајна поткрепа за МЖ. Тој започнува од субкарличните тетиви, ја обложува скоро целата МЖ и испушта бројни ламели кои поминуваат низ жлезденото ткиво и влегуваат во состав на интерстициумот на МЖ кои се поврзуваат со медијалниот суспензорен лигамент (5). Медијалните суспензорни лигаменти се најважни (два по број) и почнуваат од дното на карлицата, поминуваат низ средината на МЖ и завршуваат на абдоменот (5). Тие се изградени од сврзно ткиво, кое има својство да се истегнува кога МЖ се полни со млеко т.е. пред молзење. Како што стареат кравите, МЖ ја зголемува својата тежина, медијалните суспензорни лигаменти често се истегнуваат, ослабуваат и губат еластичитет, дозволувајќи им на боските да се

истакнуваат на нанадвор (*латерално*), што може да доведе до тешкотии при прицврстувањето на чашките за молзење на боските, како и проблеми од оштетување на боските и зголемен ризик од маститис (3).

Млечната жлезда кај кравите се состои од четири четвртини или мамарни комплекси (6). Медијалниот суспензорен лигамент ја дели МЖ на лева и десна (2, 6), додека фиброзна мембрана ги поделува четвртините т.е. мамарните комплекси на предни и задни (6), што значи дека не постои никаков премин на млечни канали помеѓу млечните четвртини и секоја претставува засебна единица (2, 3). Задните четвртини учествуваат со 55-60% од севкупната тежина на МЖ (2), додека Tapcin V. et al. (2007) во својата студија наведуваат дека од вкупниот принос на млеко 47% се добива од предните четвртини, додека 53% е од задните четвртини (7).

Секој мамарен комплекс на МЖ се состои од: боска (*papilla mammae*) и жлездено тело (*corpus mammae*) (2, 6).

Боската (*papilla mammae*) е дел од МЖ низ кој се излачува млекото. Нивната форма варира од цилиндрична до конусна (3), цилиндричните боски се помалку склони кон маститис, а главно се и најчести (5). Просечната должина на боските е различна Slyzius E. et al. (2014) утврдиле дека предните боски се за 0.7 цм подолги и за 0.33 цм со поголем дијаметар од задните боски и наведуваат дека предната десна боска е најдолга и со најголем дијаметар (8). Boboš S. et al. (2005), наведуваат дека просечната должина на предните боски е 6.6 цм со дијаметар од 2.9 цм, додека задните се долги 5.2 цм и дебели 2.6 цм (2). Нивната должината се зголемува од првата до третата лактација и потоа останува константна (5).

Во самата боска се наоѓа сисната цистерна (*sinus papillaris*) која е продолжение од жлездената цистерна кои меѓусебно се поделени со стеснување т.е. крикоиден прстен (*annular folds, англ.*) (2). Капацитетот на сисната цистерна е 10-50мл, површината може да е мазна или со хоризонтални, односно лонгитудинални набори (3), обложена со двослоен кубичен епител (9). Непосредно на соединувањето на цистерната на боската и каналот на боската, 6-10 надолжни набори од цистерната се конвергираат во розета на Фурстенберг (*Furstenberg rosette англ.*) (3). Млекото од цистерната се излачува надвор преку изведен канал (*ductus papilaris*), кој е со просечна должина од 6-14 мм (1), додека дијаметарот се движи од 0,4мм на дисталниот крај до 1,63мм на проксималниот крај и во просек изнесува 0,46мм кој со стареење се

издолжува и се зголемува во дијаметар (3). Paulrud C. O. (2005) во својот труд наведува дека каналите на задните боски се подолги за 5-10% од каналите во предните боцки (10). Изводниот канал е набран и обложен со кератинизиран епител (5), додека од надвор е опколен со циркулаторен мускулен цвинктер (*m. sphincter*) кој е најважен мускул во превентивата од маститис (5). Изводниот канал дистално завршува со еден отвор (*ostium/orificium papillae*) (3). Млечната четвртина која е со пократок и поширок изводен канал има поголема предиспозиција кон инфекција (6).

Жлездено тело (*corpus mammae*) има лобусна градба, каде секој лобус е изграден од повеќе капсулирани лобулуси (2) и секој лобулус е изграден од околу 200 микроскопски алвеоли (1). Од лобулусите излегуваат лобулусни канали кои се влеваат во лобусните канали, а овие се влеваат во одводните млечни канали (*ductus lactiferous*) (9). Млечните канали се влеваат во млечната цистерна (*sinus lactiferous*), која служи за складирање на млекото пред да премине во цистерната на боската, и неговата запремина е 500мл (1). Алвеолите се основна и засебна градбена единица на МЖ за синтеза и секреција на млекото, нивниот промер во просек е 0.1-1.3мм (2). Алвеолите од внатре се обложени со призматичен епител, чија висина се менува во зависност од фазата на лактација (1, 9). Покрај секреторниот епител, околу алвеолите се наоѓаат и миоепителни клетки, кои под дејство на окситоцинот предизвикуваат истиснување на млекото од тубуло-алвеоларниот лумен во одводните млечни канали (1, 9).

2.2 Одбрамбен механизам на боската и каналот од боската

Млечната жлезда поради својата анатомска поставеност, а особено нејзините боски постојано е во контакт со најразлични патогени микроорганизми (М/О) кои може да потекнуваат од околината, машината за молзење или рацете на молзачот. Кожата на боските не содржи лојни и потни жлезди (1, 2), и за разлика од епителот на кожата, епителот на боските е 4-5 пати подебел од него (5). Кожата на боските е обложена со заштитна прекривка од масни киселини кој делуваат бактериостатски на патогените причинители на маститис (5, 11, 12). Потврдено е дека со оштетување на боската се зголемува колонизацијата од *Staphylococcus aureus* (11, 13). Единствениот контакт на МЖ со надворешната средина е преку каналот на боската (13, 14, 15) и најголем број од инфекциите на МЖ настануваат преку него, со исклучок на патогените М/О како што се: туберкулоза, бруцелоза и лептоспироза кои се

пренесуваат преку крвотокот (12). Маститис патогените М/О поминуваат во МЖ со цел да најдат средина која е топла, влажна и богата со хранлива материја, а тоа им е потребно за брз раст и размножување (12). Исходот од колонизацијата на боската зависи од повеќе фактори, но пред се од: вирулентноста на причинителот, здравствената состојба на животното како и имунолошкиот систем на МЖ (13). Каналот од боската претставува првата одбранбена линија против маститисот (11, 15). Својот ефект го постигнува како физичка бариера и извор на антимикробни субстанции (12, 16). Околу самиот изведен канал се наоѓа мазен мускулен свинктер со спирална форма, кој со неговата активност го затвара каналот т.е. го спречува испуштањето на млекото помеѓу молзењата и претставува физичка бариера против влезот на различни патогени М/О (3, 10, 12, 13). Луменот на изводниот канал од боската има назабена форма (3, 13), обложен е со повеќеслоен сквамозен епител кој постојано се обновува и содржи во себе до 85% кератин (12, 13, 14). Кератинот е способен да ги врзе и имобилизира повеќето видови на инкапсулирани бактерии кои предизвикуваат маститис, а со самото тоа да ја спречи нивната миграција во млечната цистерна (11, 12, 13). Врзаните бактерии за кератинот се исфрлаат заедно со него во следното молзење (11, 13), и затоа кравите кои се молзат по три пати на ден имаат пониска инциденца на маститис од кравите кои се молзат два пати во текот на денот. (17). Освен физичката улога, кератинот во изводниот канал има и антимикробни својства (11, 13), т.е. овој кератин содржи бактериостатски естерифицирани и не естерифицирани типови на масни киселини, како што се: лаурицилни, палмитски и линолејни киселини и фибрински (vlakнести) протеини. Овие киселини и протеини електростатски се поврзуваат со маститис патогените М/О, менувајќи им го клеточниот сид со последователна промена на осмотскиот притисок, лиза и смрт (12, 16). Paulrud C. A. (2005) во својот труд наведува дека различниот липиден состав во каналот има различен бактериостатски ефект према одредени маститис патогени М/О (10). Дополнително, катјонските протеини присутни во кератинот со електростатски сили се врзуваат за бактерискиот сид и имаат инхибиторен ефект (14, 16) особено према некои патогени М/О, како што се: *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* (12, 16). Овие катјонски протеини исто така се изолирани и од бовините неутрофили (11, 13).

Alfonso Z. et al. (2002), наведуваат дека иако машинското молзење е неминовна алатка во современото одгледување на молзни крави сепак тие укажуваат на три

последници од машинско молзење и тоа: проксимално придвижување на маститис патогените М/О, зголемена контаминација на надворешниот канал и промена во одбранбениот потенцијал на боската (13). Дополнително, по молзењето каналот на боската останува отворен уште 2 часа (11, 12) и доколку во тој период кравата легне може да дојде до контаминација на каналот, што не значи и развој на инфекција (2).

2.3 Маститис, поделба и начин на инфекција

Настанувањето на маститисот најчесто е како последица на постојаната борба помеѓу бактериите кои можат да се населат внатре во четвртината и одбранбениот механизам кој настојува да ги елиминира (6). Маститисот сè уште претставува најраспространета и најскапа болест кај млечните крави насекаде во светот (18, 19, 20, 21, 22), а воедно и најголема загриженост по благосостојбата на кравите (23, 24). Маститисот е воспаление на МЖ независно од тоа кој е причинителот, и се карактеризира со физички, хемиски и бактериолошки промени во млекото, како и патолошки промени на самото жлездено ткиво (23, 25, 26).

Според клиничката слика маститисот е поделен на клинички и субклинички маститис. **Клиничкиот маститис (КМ)** се карактеризира со видливи промени т.е. формирање на партали/згрушоци во млекото, оток и болка на самата МЖ како и можна промена во целокупната здравствена состојба на кравата (*депресија, апатија, хипертермија*) (24). **Субклиничкиот маститис (СМ)** е дефиниран како воспаление на МЖ без видливи клинички знаци, и тоа е основниот проблем што СМ не може да се утврди без изведување на дијагностички тестови (27, 28).

Првичен и најлесен начин за негова дијагноза е одредување на бројот на соматските клетки (БСК) со директни или индиректни методи и дополнителна микробиолошка изолација и идентификација (22). Субклиничкиот маститис е широко распространет во краварските фарми, каде на еден клинички маститис доаѓаат 15-40 случаи на СМ (17, 28). Не дијагностицираните крави со СМ се потенцијален извор за инфекција на здравите крави и стада, а не навременото третирање може да доведе до индурација на жлезденото ткиво од МЖ (17, 21, 29). Исходот од СМ може да биде: **а)** да премине во клиничка форма, **б)** да дојде до само излекување и **в)** да премине во хронична форма на маститис. Хроничниот маститис претставува СМ со долго траење,

со прогресивна индурација на паренхимот и изразито намалена продукција на млеко (6).

Економските загуби од СМ се должат поради:

- 69% од севкупните загуби во производството на млеко се како последица на намалената млеко-продукција;
- отфрлање на абнормалното млеко како и млекото третирано со антибиотици;
- намалување на квалитетот и цената на млекото како последица на високиот број на бактерии и БСК;
- трошоци за лекови и трошоци за ветеринарни услуги и лаборатории;
- зголемен ризик од појавата на клинички маститис;
- претставува втора болест како причина за прерано шкартирање на кравите после репродуктивните проблеми;
- претставува извор на зараза за не дијагностицираните / здравите крави во самото стадо или / и за другите краварски фарми;
- и претставува болест за која се трошат најмногу антибиотици и проблеми со присуство на резидуи од антибиотици во млекото и млечните производи како и развој на антимикробна отпорност (11, 18, 21, 22, 29, 30).

Инфекцијата на млечната четвртина може да настане преку:

- **Галактоген пат на инфекција** – влезот на маститис патогените М/О настанал преку каналот на боската па понатаму преку цистерната и млеководите се до алвеоларните простори. Овој начин на инфекција го користат најголем број од причинителите на маститис.

- **Хематоген пат на инфекција** – ова е и единствениот пат за влез на инфекцијата во МЖ предизвикана од *Brucella spp.*; *Listeria spp.* и *Mycobacterium spp.* Инфекцијата настанува периваскуларно во околното интра-лобуларно и интра-алвеоларно ткиво.

И **лимфоген пат на инфекција** – ширењето на инфекцијата се одвива во лимфните отвори и долж лимфните садови, каде примарна врата и место на размножување се

раните на кожата или убоди од инсекти кои предизвикуваат алергиско-токсична реакција на местото на убодот. Најчесто овој пат на инфекција го користат *Arcanobacterium pyogenes*, клостридијалните инфекции, некролитичките бактерии како и *Staphylococcus aureus* (2, 12).

2.4 Застапеност, начин на ширење, патогеност и превентива на најчестите предизвикувачи на СМ кај молзните крави

До сега се откриени околу 135 различни бактериски видови како потенцијални предизвикувачи на СМ (30), како и во многу помал број се изолирани и: квасци, алги, габи, хламидија и вируси (12).

Според нивните карактеристики, најчестите маститис патогените бактерии се поделени на:

Заразни / контагиозни маститис патогени бактерии: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma bovis* и *Corynebacterium bovis*.

Околински маститис патогени бактерии : колиформни М/О (*Escherihia coli*, *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp.*), *Coagulasa negativni staphylococci* , *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*. Во многу поретки случаеви како причинители се вбројуваат и: *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Nocardia*, *Protothecae* и др.

2. 4.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus претставува грам позитивна, неподвижна, аспорогена факултативно анаеробна топчеста бактерија, каде по делбата може да остане поединечно, во парови или тетрода, но најчесто има неправилен изглед во форма на грозд (31, 32). Таа претставува коагулаза позитивна β -хемолитична бактерија, но некои соеви се и: α - хемолитички, $\alpha+\beta$ хемолитички, δ -хемолитична, не-хемолитички, па и коагулаза негативни (33).

Staphylococcus aureus пред сè е маститис патоген кај говедата, кој влијае на здравјето на животните, благосостојбата, продукцијата на квалитетно млеко, а

следствено и на приходот на фармата. Оваа бактерија претставува закана за јавното здравје поради безбедноста на храната, проблемите со употребата на антибиотици и потенцијалот за двонасочно пренесување помеѓу луѓето и кравите (34). Освен кравите, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) може да ги нападне и другите животни, додека кај луѓето е доминантен предизвикувач на апсцес на дојка (24). Застапеноста на маститисот предизвикан од *S. aureus* во светот варира од 5 до 18%, додека застапеноста во стадо се движи од 30 до 85% (24).

Главен резервоар на *S. aureus* е хронично инфицираната МЖ, каналот на боската и лезиите на боската (33, 35). Може да се најде на кожата од боската и МЖ како и во репродуктивниот тракт, муцката и ноздрите, постелката, воздухот во молзилиштето и опремата за молзење (33, 34, 35, 36). Инфекцијата од *S. aureus* најчесто настанува во првите две недели после отелувањето или 7-10 дена пред отелувањето (37). Инфекцијата во стадото се шири преку: машината за молзење, крпите кои се користат за бришење, рацете на молзачот, не соодветните практики кои се користат при молзењето и инсектите (6, 38). Мувите ги трауматизираат боските и пренесуваат инфекцијата (34). Во студија каде е користен инсектицид нанесен на самата опашка резултирало со само еден маститис на 100 јуници, споредно со контролната група каде се развиле 18 маститиси на 100 јуници (38). Во стадото, инфекцијата може да се внесе преку внесување на нови животни т.е. молзни крави и јуници. И првотелките претставуваат резервоар за *S. aureus*, бидејќи застапеноста кај нив во првата лактација била од 12 до 15 % (38). Најчесто, инфекцијата кај нив е настаната како последица на взаемно цицање во групните боксови, пиење на млеко од инфицирани крави, како и контаминација од инсекти (38).

Откако *S. aureus* ќе го контаминира отворот на боската таму може да перзистира и да се размножи, а потоа да навлезе во каналот на боската со прогресивна колонизација или пак со промена на интрамамариот притисок (кој настанува како последица на промена на вакумот за молзење, истегнување на каналот на боската и зголемување на интрамамариот притисок пред молзењето) (39). Колонизацијата настанува пред сè поради својството за адхерентност што го има *S. aureus* (2). Со адхерентност може полесно да се искачи во проксималните млечни канали и алвеолите или да се дисеминира преку леукоцитите (2, 34), бидејќи *S. aureus* може да преживува во леукоцитите, каде откако ќе умрат леукоцитите (во просек за 1 до 2 дена) на новата локација би го испуштиле причинителот (34,38).

Повеќето автори се согласни дека по влезот на *S. aureus* во четвртината, понатамошниот тек може да продолжи во четири различни форми на маститис и тоа (34, 38):

- субклинички маститис

- хроничен маститис (*mastitis et galactoforitis catarrhalis chronica / interstitialis fibrosa seu apostematosa*): се карактеризира со зголемен БСК и намалување на количината и квалитетот на млекото, каде перзистенцијата може да трае во текот на целата лактација, а голема е веројатноста и во следните лактации. После подолг период од инфекцијата доаѓа до атрофија на четвртината како последица на индурација со сврзно ткиво, а во некои случаи може да се формираат и апсцес со големина на тупаница, кој некогаш може да ја зафатат и целата четвртина.

- акутен катарален галактофоритис и маститис (*mastitis et galactoforitis catarrhalis acuta*): се карактеризира со намалена количина на млеко, формирање на парталчиња во млекото, оток, болка и црвенило на МЖ, во некои случаи и со промена во општата здравствена состојба.

- гангренозен маститис или перакутен маститис (*mastitis necroticans-haemorrhagica*) : се појавува со изразит брз тек, видливо нарушена општа здравствена состојба, со ладна МЖ на која се појавува црвено-плаво обојување во пределот на основата од боските и крваво млеко. Доколку изостане навремената терапија, најчесто завршува со летален исход.

Понатамошниот тек на инфекцијата односно во каква форма ќе се развие маститисот зависи од: состојбата и активноста на одбранбениот механизам на кравата и вирулентноста на *S. aureus* (2, 34).

Намалената ефикасност на фагоцитите против инфекцијата претставува дефект во одбранбениот механизам на МЖ. Тоа се должи поради: фагоцитозата на млечните компоненти кое доведува до намалување на количината на хидролитичките ензими во фагоцитите, намален резервен гликоген во неутрофилите во млекото, ниско ниво на комплемент и опсонизирачки антитела против *S. aureus* во млекото и обложување на неутрофилите со казеин и губење на неутрофилната псеудоподија (39, 40).

Патогеноста на *S. aureus* зависи од комбинираното дејство на повеќе од четириесет различни екстрацелуларни токсини, ензими и површински протеини (39). Факторите на вирулентност на *S. aureus* се поделени на: **1)** фактори на површината од бактеријата и **2)** секреторни фактори (39).

Вирулентните фактори на површината се најважни при адхеренцијата на *S. aureus*, а се изразуваат кога таа е во фаза на раст, а тие се:

-**Протеин А (SpA)** има големо влијание во адхезијата, создава агрегација со Fc-фрагментот од IgG антителата (32, 39, 41, 42), и ги спречува процесите на опсонизација и фагоцитоза во подоцнежната фаза од интрамамарната инфекција (ИМИ) (39, 41, 35). Откриен е кај 55-60 % од соевите изолирани од ИМИ кај говедата (43).

- **Клампинг фактор (Clf-A)** е посредник во згрутчувањето (*формирање на чаури*) и адхерентноста на фибриногенот во присуство на фибронектинот (32, 41), а особено е значаен во посредувањето на ендоваскуларната инфекција (42). Higgins J. et al. (2006) наведуваат дека независно од првичната функција, Clf-A има силно антифагоцитно дејство кое се надополнува со дејството на протеин А (42).

-**Капсуларен полисахарид** е егзополисахариден слој кој го покрива клеточниот сид кај некои соеви на *S. aureus* и може да биде како: флексибилна микрокапсула или цврста капсула (39), влијае во превенцијата од фагоцитозата и опсонизацијата (32, 41, 42), адхеренцијата на бактеријата и нејзината перзистентност (41, 44).

-**Слуз** е егзополисахаридна компонента лабаво врзана на површината која може лесно да се изгуби во *in vitro* услови за време на перење на бактериите (39). Таа има карактеристична особина за групирање на бактериите во микро колонии, како и со капсуларниот полисахарид може да послужат како примарен рецептор за адхезија или може да се продуцираат откако бактериите веќе се адхерирале.

Секреторните вирулентни фактори го промовираат оштетувањето на ткивото, ширење на инфекцијата и заштита на бактеријата од имунолошкиот одговор на домаќинот, а се експонирани пост-потенцијалната фаза на раст (39). Тие се поделени во три групи и тоа како: цитолитички токсини, ензими и ентеротоксини.

Најчестите **цитолитички токсини** кај говедскиот *S. aureus* се :

- **α** – **хемолизин** претставува цитолитички токсин кој се синтетизира за време на размножување на *S. aureus*, и го произведуваат 20-50% од говедските изолати (43). Тој се врзува за мембранските липиди на епителната клетка каде што предизвикува трансмембрански пори што резултира со истекување на молекулите со ниска молекуларна тежина од цитозолот и умирање на клетката (32, 41). Дваесет и четири часа по изложеноста на α -хемолизинот се забележува ослабени клетки и клеточен простор со мали празнини помеѓу клетките, но со мал процент на клеточна смрт (39). Епителните клетки од боската се најмногу отпорни, додека секреторните клетки се најосетливи на овој токсин (39).

- **β** - **хемолизин** претставува исто цитолитички токсин, кој го излучуваат 75-100 % од соевите на *S. aureus* изолирани од маститисот кај говедата (32, 43). Тој го хидролизира сфингомиелинот присутен во плазматската мембрана што резултира со нејзина зголемена пропустливост каде доаѓа до истекување на K^+ , а влез на Na^+ , Cl^- и Ca^{+} (39, 41). Прогресивното испуштање на јони доведува до губење на тургорот на клетката и распаѓање на електричниот потенцијал на плазматската мембрана, додека влезот на Ca^{+} доведува до трошење на АТР во клетката каде се јавува релаксација на актин-миозинските филаменти и дисфункција на клетката (39). β -хемолизинот е цитотоксичен за секреторното ткиво и ги зголемува штетните ефекти на α -токсинот. Ваквата клетка е многу по осетлива за адхерентност и инвазија од бакетијата, и затоа се мисли дека двата токсина имаат големо влијание во адхерентоста на *S. aureus*.

-**Леукоцидин** е цитолитички токсин, кои го произведуваат голем дел од говедските изолати во *invitro* услови (43). Ги уништува пред сè неутрофилите и макрофагите со што го интензивира воспалителниот одговор и оштетувањето на ткивото (32, 39).

Ензимите на *S. aureus* му овозможуваат да ги користи млечните супстрати за својот метаболизам и за продорноста низ ткивата (39). Најчестите ензими кој се вклучени во патогенезата на ИМИ се: коагулаза, колагеназа, каталаза, протеази, дезоксирибонуклеаза, хијалуронидаза, липази, термонуклеаза, бета-лактамаза и многу други (6, 31).

Стафилококните ентеротоксини се екстрацелуларни протеини, кои ги излучуваат околу 50% од изолатите добиени од ИМИ кај говедата (36, 39). Познати се осум серолошки различни типови на ентеротоксини: А, В, С₁, С₂, С₃, D, Е и F, кои се термостабилни, и можат да доведат до алиментарна интоксикација, а при тоа да не

биде изолиран *S. aureus* (36). Најчесто ентеротоксините се произведени од хуманите соеви на *S. aureus* (31).

Токсичен шок синдром токсин -1 има ефект врз адхерентноста, инвазијата и патогеноста на *S. aureus* во МЖ (39). Разликата со останатите ентеротоксини е што тој се апсорбира низ цревата и има системски ефект, а не само локален на цревата (36).

Пријавени се различни проценти од стапката на излекување на маститисот предизвикан од *S. aureus*, и тој процент се движи од 4-92% (33, 34), додека за хроничниот маститис пријавена е стапка на излекување од само 35% (45). Испитувањето на антимикробната осетливост на *S. aureus* е неопходна алатка при негово терапирање, ова особено важи за СМ и хроничниот маститис, иако добиените резултатите *invitro* не значат дека ќе се постигне сигурен успех и *invivo* (45).

2.4.2 *Streptococcus uberis*

Streptococcus uberis (*S. uberis*) се грам позитивни бактерии, со кокоиден облик, поредени во парови или во синцир, кои предизвикуваат α -хемолиза, (или α -зелена хемолиза), а некои соеви и не предизвикуваат хемолиза (31, 46). Тој претставува убиквитарен микроорганизам кој се населува на животните и нивната околина (46). Изолиран е најчесто од: усните на животното, тонзилите, кожата, усната празнина, бурагот, фецесот, респираторниот тракт, отворот на боските и каналот на боската кај инфицираните четвртини (46, 47, 48). Исто така, во околината најчесто може да се најде во ѓубрето и другите органски материи што се користат како простирка, пред сè сламата, а потоа и пилевината (6, 47, 48).

Streptococcus uberis се вбројува и како околиски и како заразен причинител на маститисот (5, 47, 49). Примарен извор на овој маститис патоген причинител претставува животната средина на кравата и изложеноста на не инфицираните четвртини на самите патогени М/О, каде инфекцијата може да настане во секое време од животот на кравата, додека примарен резервоар за заразниот *S. uberis* претставуваат заразените МЖ каде инфекцијата се пренесува за време на самиот процес на молзење (49). Мувите претставуваат важен фактор во пренесувањето на *S. uberis*, а тоа е и една од причините за зголемената застапеност на маститисот предизвикан од овој причинител во летниот период (6, 47).

Инфекцијата на МЖ со *S. uberis* пред се е галактогена, а високиот број на бактерии во животната средина ја зголемува инциденцата на инфекцијата (46). Најчест периодот за инфекција претставува пресушување на самите крави до раната лактација (5, 48, 50), а како причина е тоа што во пресушниот период престанува молзењето т.е. испирањето на самиот канал од боската. Leigh J. A. (1999) наведува дека во почетокот на пресушниот период *S. uberis* има поголема веројатност да се пробие низ каналот на боската, но со помала веројатност да се воспостави во рамките на жлезденото ткиво. Но, подоцна каналот на боската станува по отпорен за пенетрација, но се зголемува подложноста на жлездата (48). Лактопероксидаза-тијоцианат-водород пероксид е антибактериски систем на МЖ против бактериската инфекција, а за време на пресушниот период му се намалува неговата активност против *S. uberis* (47). Douglas V. L. (1999) прикажала позитивна корелација помеѓу инциденцата на инфекција и возраста на животно (47). Додека Zadoks R. N. et al. (2001) утврдиле зголемена застапеност од реинфекција со *S. uberis* во четвртините кои биле заздравени од истиот причинител (49).

Вирулентните фактори на *S. uberis* не се комплетно разјаснети и нивното изразување варира кај различни соеви. *S. uberis* има способност за адхеренција и инвазија за епителот на МЖ (46), но неговата адхерентност не е толку силна како адхеренцијата на *Streptococcus agalactiae* и *S. aureus* (47). Исто така Douglas V. L. (1999) наведува дека *S. uberis* во *invitro* услови не може да се адхерира на здраво млечно ткиво (47). Ензимите на *S. uberis* особено се важни и влијаат на дисеминацијата на овој патоген во МЖ (46, 51). Сите соеви на *S. uberis* произведуваат слободна хијалуронидаза, која ја подобрува дистрибуцијата и пенетрацијата на овој патоген и ја спречува пролиферацијата на епителното ткиво (46, 48). Не сите соеви на *S. uberis* формираат капсула, каде инкапсулираните соеви се поотпорни (47, 48) и во капсулата содржат хијалуронична киселина која ја инхибира активната опсонизација на бовините мамарни макрофаги (47, 48). Времетраењето на инфекцијата е различно, од 2 до 20 месеци (2), причинителот поради своите вирулентни фактори може да перзистира во МЖ, и од околински да се трансформира во контагиозен патоген (46).

Поради колонизацијата на каналот од боската, лекувањето на СМ предизвикан од *S. uberis* е најдобро да се направи за време на пресушувањето на кравата (50), пред се со интрамамарна апликација на антибиотикот. Субклиничкиот маститис предизвикан од

S. uberis не е подобен за лекување во периодот на лактацијата, сем ако не е клинички маститис бидејќи лекуваните четвртини стануваат по подложни на ре-инфекција (49).

2.4.3 *Coagulasa negativni staphylococci*

Coagulasa negativni staphylococci (CoNS) последните децении се најчест причинител на маститис кај кравите (52), особено на фармите кои успешно ја спровеле програмата за контрола против контагиозните причинители на маститис (6, 53). Застапеноста на CM и KM во различни земји е различна и се движи во просек 6-72% и 6-30% (53).

Coagulasa negativni staphylococci се хетерогена група на бактерии која се состои од 45 различни видови и подвидови (54), но најчесто изолирани видови кај кравите се : *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus sciuri* и *Staphylococcus intermedius* (53). Сепак, како најдоминантни причинители на CM се: *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus xylosus* и *Staphylococcus epidermidis* (52, 55, 56).

Coagulasa negativni staphylococci најчесто се поврзуваат со микрофлората на кожата од говедата или со блиската околина на самите крави т.е. од материјалите кои се користат за простирка. *Staphylococcus chromogenes* е добро прилагоден за самите крави и може да се изолира од кожата на МЖ кај јуниците како и од каналот на боската, секретите од ново отелените јуници и крави во лактација, исто така и од носот и вагината (56). *Staphylococcus epidermidis* е добро прилагоден на кожата на човекот и е редок или отсутен од микрофлората кај говедата и е чест причинител на маститис кај жените (24). *Staphylococcus haemolyticus* е изолиран од кожата на МЖ (56). *Staphylococcus xylosus* и *Staphylococcus sciuri* се често најдени како дел од нормалната микрофлора на кожата кај кравите, како и кај други цицачи и птици, а *Staphylococcus xylosus* често се користи како стартер култура во ферментацијата на млекото (53, 56). *Staphylococcus hyicus* најчесто се сретнува кај KM кај кравите и ексудативниот дерматитис кај свињите, додека *Staphylococcus simulans* се среќава и кај KM и CM (56).

Традиционално тие се сметаат за слаби (*minor* англ.) маститис патогени (52, 57), и најчесто се причинители на СМ, а поретко на КМ. Најчесто предизвикуваат КМ со слаби клинички знаци (55, 57, 58), но повремено биле забележани и маститиси со тешки клинички знаци (53). Сепак, другата загриженост е повисоката застапеност на В - лактамската продукција кај *CoNS* во споредба со *S. aureus*. Во Шведска тој процент бил 35% према 15% од изолатите на *CoNS* и *S. aureus* излирани од СМ (56). Со тоа *CoNS* би биле резервоар за трансфер на генетски елементи за подобрување на патогеноста и антибиотската отпорност на *S. aureus* (24).

Застапеноста на маститисот предизвикан од *CoNS* највисока е кај јуниците (првотелките), а многу пониска кај кравите кои се породувале повеќе пати. Кај јуниците (првотелките) инфекцијата настанува најчесто пред и после отелувањето (рана лактација), додека кај кравите кој раѓале повеќе пати инфекцијата е во подоцнежниот период од лактацијата (52, 53). *CoNS* може да ја колонизираат МЖ т.е. врвовите на боската и тоа кај јуници со 10 месечна старост (52). Додека пак, во едно истражување кај јуниците на две недели пред телење, на врвот на боските најдоминантен изолат бил *Staphylococcus chromogenes* со 28%, а останатите *CoNS* (*Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus epidermidis*) биле изолирани со помалку од 3.5% (53). *CoNS* пред се ги зафаќаат кравите со највисока продукција на млеко (56). Дистрибуцијата помеѓу видовите на *CoNS* била различна, т.е. *Staphylococcus chromogenes* најчесто е изолиран кај првотелките пред и после отелувањето (52, 53, 56). *Staphylococcus epidermidis* најчест е кај кравите кои се породувале повеќе пати (53, 56), додека *Staphylococcus simulans* подеднакво е застапен и кај првотелките и кај кравите кои се породувале повеќе пати, но во подоцнежниот период од лактацијата (52, 56).

Тие можат да предизвикаат и перзистентни инфекции кои резултираат со умерено зголемување на БСК во просек од 250.000 до 400.000 кл/мл (6, 52, 56, 57). Поради тоа што *CoNS* претставуваат голема група од различни видови и под видови на бактерии со различни патогени карактеристики добиени се различни резултати за нивниот ефект во млечната индустрија.

Некои истражувања покажале и спротивен ефект т.е. кравите со ИМИ предизвикана од *CoNS* имале поголем млечен принос од здравите крави (55, 56). Таквата состојба е како последица на заштита на МЖ од инфекција од големите

маститис патогени M/O. *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus epidermidis* и др. CoNS лачат антибактериски пептиди и имаат протективна функција во спречувањето на населувањето во МЖ на големите маститис патогени M/O (24, 57). *In vitro* е потврдено дека *Staphylococcus chromogenes* произведува инхибиторни супстанции кои го инхибираат растот на *S. aureus*, *S. uberis* и *Streptococcus dysgalactie*, но не и на *Escherichia coli* (52, 57), или пак зголемениот БСК во четвртината не дозволува да се развијат нови инфекции (52). Додека Piepers S. et al. (2011) додаваат дека колонизацијата на боските кај јуниците со CoNS пред породувањето ја заштитува МЖ од околините и заразните патогени M/O во раната лактација (59).

Во хистопатолошките промени на четвртини инфицирани од *S. aureus* и CoNS главно покажале хроничен воспалителен одговор со знаци на репарација, но не биле забележани никакви разлики во хистопатолошките промени помеѓу *S. aureus* и CoNS (53, 58). Капацитетот на адхезија на видовите на CoNS према епителните клетки од МЖ е речиси еднаков со адхезивниот капацитет на *S. aureus* и од тука доаѓа и стимулацијата на имунолошкиот одговор кај кравите т.е. зголемување на БСК, но од друга страна инвазивноста на CoNS е помала од *S. aureus* и на тој начин потенцијално предизвикуваат помало оштетување на секреторното ткиво (53, 55). CoNS изолирани од СМ произведуваат ентеротоксин (53), додека пак *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus hyicus* и *Staphylococcus xylosus* дополнително формираат и биофилм, па поради тоа и овие видови се перзистентни при инфекција на МЖ (57). Во едно истражување за проучување на вирулентноста на *S. aureus* и CoNS, во глумци инакулирале изолати на *S. aureus*, *Staphylococcus chromogenes* и *Staphylococcus intermedius* добиени од хроничен маститис. Дури и најмалку вирулентните соеви на *S. aureus* биле по вирулентни и од *Staphylococcus chromogenes* и *Staphylococcus intermedius* (60).

Стапка на спонтано излекување на СМ предизвикан од CoNS е висока, Krishnamoorthy P. et al. (2016) пријавиле дека таа може да стигне до 60-70% (53). Во повеќето земји се избегнува третирање на инфицираните животни со CoNS за време на лактацијата, поради каренцата од антибиотикот.

2.4.4 *Streptococcus agalactiae*

Streptococcus agalactiae (s. *agalactiae*) е еден од најчестите и најпознатите заразни патогени М/О што доведуваат до маститис кај млечните стада ширум светот (61, 62, 63). Тој е предизвикувачки агенс на неколку болести кај разни други животински видови, вклучително и кај луѓето. Најчесто предизвикува животното загрозувачка болест кај новороденчиња, пред се : пневмонија, синдром на септички шок и менингитис со висока стапка на смртност (64, 65, 66). Во Јужна Америка, пријавената застапеност во стадата се движи: 60% во Бразил, 42% во Колумбија и 11% во Уругвај (61, 67, 68, 69). Во Данска, веќе неколку децении воспоставена е национална програма за искоренување, каде и покрај постигнувањето на многу ниски нивоа кон крајот на 1980-тите и почетокот на 90-тите години (2-5%), сепак од 2000 год. постои очигледен пораст во распространетоста на инфекцијата на ниво на стадо (70, 71). Овој тренд е пријавен и во Норвешка и во останатите скандинавски земји (62, 71).

S. agalactiae во ветеринарната медицина или познат како група Б стрептокок (GBS) во хуманата медицина, претставува грам-позитивна кока, која често се забележува како расте во ланци (68). Добро расте на крвен агар создавајќи ситни сифкасти колонии со тесно подрачје на β -хемолиза, а ретко α или γ -хемолиза (31, 70). Предизвикува пред се СМ со хроничен тек, без можност за само излекување, а во ретки случаи и благ КМ кој исто така поминува понатаму во хроничен маститис (67, 70, 72, 73). Се проценува дека загубата на млеко поради СМ предизвикан од *S. agalactiae* е 12-15% (72), со изразени физички и хемиски промени на млекото придружени со патолошки промени на жлезденото ткиво (67), со перманентен висок БСК (68, 73), кој може да дистигне и до 100.000.000 кл/мл (5).

S. agalactiae е високо контагиозен облигатен паразит на МЖ кај говедата (68, 70, 71, 72). Во стадото најчесто се внесува преку внос на инфицирани крави, каде поради тивката и контагиозната природа многу брзо се шири помеѓу кравите (64). *S. agalactiae* може да расте и да се размножува само во МЖ и таа пред сè е главниот резервоар (63, 64, 68, 73). Се пренесува од крава на крава пред сè за време на постапката на молзење, а најчесто преку инфицираните молзници, рацете на молзачот, водата за испирање и крпите за бришење на МЖ (64, 70, 71). Надвор од МЖ не се размножува и не може долго да преживее (14-21 ден во млечната маст, 10-21 ден на кожата на говедата, рацете и облеката на молзачот, во свежа вода повеќе од 4 недели).

Но, малку е познато за опстанокот во околината на фармата (73). Бидејќи перзистира на рацете на молзачите, особено кога рацете на молзачите се со рагади, претставува можен начин преку кој се шири инфекцијата од фарма на фарма.

Кај луѓето главниот резервоар на *S. agalactiae* е гастроинтестиналниот тракт, каде и до 30% од луѓето можат да бидат колонизирани, а без видливи клинички знаци, со помал процент на колонизација во урогениталниот тракт и грлото (73, 66). Jørgensen H. J. et al. (2016) во своето истражување утврдиле дека оро-фекалното пренесување на *S. agalactiae* може да биде од епидемиолошко значење кај млечните крави (73). *S. agalactiae* е пронајден во ректалните брисови од млечните крави и брисевите од околината, со значителна корелација помеѓу наодот во водата за пиење и ректалните брисеви. Дури 60% од примероците во животната средина биле позитивни на *S. agalactiae* и покрај тоа што примероците на млеко во испитуваните стада биле негативни. Со ова, се укажува на втор циклус на пренос на *S. agalactiae* и тоа преку околината, водата за пиење и евентуална загадената опрема за хранење. Не е познато колку овие циклуси на пренесување често се во интеракција, но за да се елиминира *S. agalactiae* од стадото потребна е и интервенција во оро-фекалниот пренос. Улогата на телињата како носители на оваа инфекција останува дискутабилна. Хранењето на телињата со инфицирано млеко може да придонесе за колонизација на гастроинтестиналниот тракт или тонзилите и индиректно да се локализира во МЖ. Понатаму, постои и сомнеж да со взаемно цицање на телињата, едни со други да ја пренесат инфекцијата само доколу претходно консумирале инфицирано млеко со *S. agalactiae* (73). Ова се должи на способноста на *S. agalactiae* да преживее 8-12 часа во усната празнина на телињата (2).

И Boboš S. et al. (2005) и Goran B. (2009) се согласни и го опишуваат начинот на инфекција дека *S. agalactiae* во МЖ влегува пред сè преку каналот на боската (2, 6). Ако епителот на млечната цистерна е оштетен/воспален од различна етиологија тоа претставува идеална средина за адхеренција и размножување на *S. agalactiae*. Овој причинител пред сè се локализира во мукозата на млечните канали, а преку нивниот сид може да помине во интерстициумот каде предизвикува леукоцитарна инфилтрација, а од тука пак може да навлезе во лимфните садови и мамарните лимфни јазли. Исходот од хроничниот тек е активирање на макрофагите и фибробластите во интра-авеоларниот простор што доведува до фиброза и губење на секреторното ткиво.

Дали ќе настане ИМИ, кога и во каква форма пред сè зависи од имунолошкиот статус на МЖ и кравата, како и од вирулентноста на *S. agalactiae* (72). *Streptococcus agalactiae* се способни да колонизираат различни ткива во телото т.е. нивната бактериска вирулентност помеѓу соевите е поврзана во разликите во способноста да: адхерираат, инвадираат и да се шират во епителот на МЖ (61, 62, 66). Maoda P. et al. (2017) наведуваат дека говедските соеви на *S. agalactiae* се најспособни за адхезија на мамарниот епител, раст во млеко, со целосна хемолиза на крвниот агар и најсилно формиран биофилм, споредено со изолатите кои потекнуваат од луѓето, околината и рибите (62). Свкупно, постои значителна хомологија помеѓу соевите изолирани од септикемични новороденчиња и маститични крави (68).

Познати се повеќе присутни вирулентни карактеристики, но најчестите утврдени кај изолатите од СМ се :

- **Полисахаридната капсула** на *S. agalactiae* е првиот фактор на бактериска вирулентност, која има можност да го промовира адхерирањето на *S. agalactiae* за епителните површини, покрај инхибирањето на фагоцитозата од макрофагите и неутрофилите (61, 72). Таа е богата со сијална киселина која и овозможува на бактеријата да навлезе во телото на домаќинот без да биде перципирана од имунолошкиот систем (61, 72). Сијалната киселина е позната како N-ацетил-неураминска киселина која ја има обилно во телото на 'рбетниците, каде е вклучена директно во разни физиолошки и патолошки промени (72). До денес се идентификувани 10 капсуларни полисахаридни серотипови (61).

- **Фибриноген врзувачки протеин Б (fbs B) и фибриноген врзувачки протеин А (fbs A)** се пред сè одговорни за адхезијата и инвазијата на *S. agalactiae* (66). Фибриноген врзувачки протеин Б (*fbs B*) има способност за врзување со фибриногенот кај различни видови не зависно од каде потекнува сојот, а неговата врзувачка способност се зајакнува во присуство на Ca^{+} . Бидејќи млекото е богат извор на Ca^{+} , колонизацијата на МЖ може да послужи како поволен фактор за присуство на овој протеин во соевите кои имаат говедско потекло (61). Gleis A. et al. (2017) во своето истражување констатирале многу мала застапеност на *fbs A* во изолатите на *S. agalactiae* кој потекнуваат од МЖ со СМ, но сепак навел дека во други студии е пријавена висока фреквенција на неговата застапеност и не ја негира неговата важност (61). Со ова се согласни и Clarisse M. A. et al. (2016) кои укажуваат дека *fbs A* е важен

протеин уште за време на раната инфекција, кој може да се вклучи во механизмот на бегство од имунолошкиот систем, спречувајќи ја опсонизацијата на макрофагите и неутрофилите (72).

- **Протеинот *hly B* наречен хијалуронат лиаза** е одговорен за патогеноста на *S. agalactiae* т.е. за оштетување на ткивото на домаќинот и кај луѓето и кај животните (61). Тој припаѓа на специјална група ензими: хијалуронидаза, одговорна за деградација на полисахаридите како што се хондроитин, хондроитин сулфат, а особено N-ацетил-глукозамин кој е дел од составот на хијалуронската киселина што го олеснува ширењето на *S. agalactiae* за време на инфекцијата (72).

-**Пилите** претставуваат површински структури на бактеријата кои се прицврстени за нејзиниот клеточниот сид (72). Тие се одговорни за колонизација на епителните клетки, формирање на биофилм и инвазија (61, 62, 66, 72, 66). Постојат три варијанти на пили и тоа : PI-1, PI-1a и PI-2b. PI-1 пилите играат важна улога во затајувањето од вродениот имунитет, пилите PI-2a се одговорни за придржувањето и формирањето на биофилмот, додека PI-2b има посебна улога во промовирањето на инвазивноста т.е. зголемување на интра-целуларниот опстанок во макрофагите (66). Опстанокот во макрофагите доведува до негова заштита, без да се прикажат клинички симптоми, што резултираат најчесто со СМ кај кравите (61). PI-2b се исклучиво присутни во изолатите на *S. agalactiae* од говедата (61, 62). Останатите два типа PI-1 и PI-1a ги има во многу мал процент, но се најфреквентни кај хуманите изолати (66).

-**Бактериски имуноген адхезин (*bib A*)** е протеин кој има улога во адхезијата, е со мала фреквенција кај изолатите од говедата, што укажува дека не е од суштинско значење и најверојатно неговата функција ја изведува друг протеин (61). Спротивно од изолатите од говеда, кај изолатите од луѓето докажано е дека со поголема експресија на *bib A* се зголемува адхерентноста на *S. agalactiae* за епителното ткиво (66).

И покрај неговата контагиозност *S. agalactiae* се уште останува осетлив на β -лактамските антибиотици (69, 70). Во принцип, и со двата главни предложени начина за третман на маститис: интрамускуларна (ИМ) и интрамамарна (ИММ) апликација, за што постојат бројни студии кои ги тестираат и двата правци на апликација добиени се променливи резултати, иако рутата за ИММ апликација најчесто е избрана за третман на СМ предизвикан од овој патоген (70).

Keefe G. P. (1997) во својот преглед наведува дека во една регионална лабораторија во Израел, за намалување на застапеноста на стадото заразено со *S. agalactiae* од 28% на помалку од 2% биле потребни 5 години (68).

2.5 Број на соматски клетки

Бројот на соматските клетки во севкупното млекото од лактофризерот ја покажува застапеноста на СМ во стадото и претставува главен индикатор за квалитетот и хигиенската исправност на млекото (23, 74, 75, 76). БСК е прифатен како интернационален стандард за утврдување на застапеноста и појавата на СМ на ниво на четврт, МЖ и стадо (17, 18, 74, 77).

Бројот на соматските клетки може да биде пресметан преку:

- директна метода: **1).** *Fossomatic 2*, **2).** *Coulter Milk Cell Counter* (18) или
- индиректна: Калифорнија маститис тест (КМТ) (78) и Ват сајд тест (23)

Просечниот БСК во млекото од не инфицираната МЖ е 50.000 кл/мл, во најголем број на случаи под 150.000 кл/мл (17, 74, 79). Hristov S. et al. (2006) наведуваат дека 50% од не инфицираните крави имале под 100.000 кл/мл, а дури 80% под 200.000 кл/мл (77). Djabri B. et al. (2002) во својата анализа од 21 истражување, добиле просек на соматски клетки од бактериолошките негативни четвртини 68.000 кл/мл (80). Зголемувањето на БСК > 200.000 кл/мл, се смета за абнормално млеко и ни укажува на инфекција на самата четвртина и/или МЖ (17, 23, 76, 77, 78).

Во млекото од не инфицираната млечна четвртина доминираат макрофагите со (35%), потоа полиморфонуклеарните леукоцити (26%), лимфоцити (24%) и епителни клетки (15%) (74). Најчестиот просек на епителните клетки е помеѓу 1-7% и тоа се изумрени клетки од алвеолите и кератинскиот слој на боската, кој при ИМИ нивниот број се зголемува (6, 23) Нискиот БСК во МЖ е важен заштитен механизам на МЖ и може да се смета како надзорен механизам во не инфицираната четвртина / МЖ (23, 74).

На БСК влијаат бројни фактори, пред сè од најголемо значење се: **а)** предизвикувачите на маститис (М/О, токсини и оштетено ткиво), и во многу помала мера **б)** физиолошко-фармаколошките фактори (раса, стадиум од лактација, лекови) и

в) стресни фактори (начин на молзење, транспорт, сместување, промена на исхраната и др.) (17,74).

2.5.1 Влијание на инфекцијата на млечната жлезда врз бројот на соматските клетки

Најважниот фактор кој влијае на зголемување на БСК во млекото на ниво на четвртина, па индиректно и на ниво на крава и стадо претставува инфекцијата (18, 23, 75, 76, 77). По пенетрацијата на причинителот во боската, макрофагите и епителот на МЖ се првата одбранбена линија која го започнува инфламаторниот одговор (6, 17, 23, 76), т.е. преку бројни воспалителни медијатори предизвикуваат: вазодилатација, васкуларна пермеабилност и хемотаксија на неутрофили, со цел патогените М/О да бидат уништени (23, 76). Иако процентуалната застапеност на неутрофилите во соматските клетки е од 1-11% (17), при инфекција нивната процентуална застапеност достигнува и до 90% од севкупните соматски клетки (17, 23). За кратко време соматските клетки во млекото од инфицираната четвртина можат да стигнат и до 1.000.000 кл/мл (23, 76). Доколку инфективниот агенс перзистира во МЖ, се менува целуларната инфилтрација со вклучување на мононуклеарните клетки (Т лимфоцити и моноцити), а доколку инфекцијата премине во хроничен тек, неутрофилите сè уште се доминантни клетки со 70-80% на застапеност (74). Просекот на БСК на ниво на стадо се зголемува, како се зголемува бројот на инфицирани четвртини. Интензитетот на промена на БСК према најзначајните маститис патогени М/О варира од крава до крава. По елиминицијата на причинителот од млечната четвртина може да поминат недели па и подолг период за да се нормализира БСК (18, 23, 77). Ова пред сè зависи од вирулентноста на причинителот, оштетувањето на МЖ и имунолошката способност на кравата (6, 77, 80).

2.5.2 Влијание на фазата од лактација, староста и бројот на телења врз бројот на соматските клетки

Бројот на соматските клетки во млекото т.е. колострумот после породувањето најчесто е повисок од 1.000.000 кл/мл (76). Тоа е како последица на прекумерната десквамација на епителните клетки поради продолжена функција на МЖ после

пресушниот период и малиот волумен на млеко во тој период (23). За 7-10 дена по породувањето БСК се намалува на околу 100.000кл/мл, само доколку МЖ не е инфицирана (23, 76). Макрофагите во раниот пост-партален период се застапени околу 68% од севкупниот БСК (23). Затоа мерењето на соматските клетки во млекото во раниот постпартален период може да се користи за детекција на нова ИМИ (6, 17). Падот на БСК во млекото продолжува се до 90-от ден од лактацијата, после тој период почнува да се зголемува.

Мицковски Ѓ. и др. (2010) наведуваат дека 7^{от} ден по отелувањето БСК бил 273.150 кл/мл, 90^{от} ден од породувањето нивниот број изнесувал 67.180 кл/мл, понатаму 300^{от} ден по породувањето бројот се подигнал на 895.130 кл/мл (1). Додека Hristov S. et al. (2006) во својот преглед укажуваат на поврзаноста помеѓу БСК и стадиумот на лактација во четвртините кои се инфицирани и кои не се инфицирани. Кравите кои не биле инфицирани, 35^{от} ден после породувањето имале 83.000кл/мл, додека 285^{от} ден после породувањето БСК се искачил на 160.000кл/мл. За истиот тој период кај инфицираните четвртини со *S. aureus* тој број бил 234.000кл/мл и се искачил на 1.000.000кл/мл (77). Zrinka Ch. et al. (2003) наведуваат дека кривата на БСК во млекото е обратно пропорционална во однос на лактациската крива (75). Со овој податок се согласуваат и многу други автори кои укажуваат дека во не инфицираните четвртини има не значително зголемување на БСК кон крајот на лактацијата, особено кога производството на млеко ќе се намали под 4кг, како последица на разредување на млекото (1, 18, 77).

Во однос на староста и бројот на лактации, БСК се зголемува како се зголемува бројот на породувања и староста на самото животно, а особено кај кравите кои се инфицирани (17, 23, 75, 76). Старите крави се склони кон подолготрајна инфекција (75). Зголемувањето на БСК примарно е како последица на зголемената застапеност од инфекции и перманентното оштетување на паренхимот од МЖ кај постарите крави (17, 18, 76). Особено е важно што постарите крави имаат по интензивен клеточен одговор во однос на малите и големите маститис патогени М/О (18).

Кравите со висок генетски потенцијал за продукција на млеко, поради физиолошкото оптеретување на МЖ, а со тоа и намалување на отпорноста покажуваат зголемена склоност кон ИМИ, а истовремено и зголемен БСК. Најмногу се склони кон инфекција во периодот пред пресушувањето и во раната лактација (75).

2.5.3 Влијание на стресот и сезоната врз бројот на соматските клетки во млекото

Направени се повеќе експериментални опити на предизвикување стрес кај кравите, но кај сите се добива податок дека кај не инфицираните четвртини има незначително зголемување на БСК, што е во спротивно со инфицираните четвртини (18, 75). Кај не инфицираните крави аплицирани се кортикостероиди, под строго контролирани услови и добиени се умерени зголемувања на БСК или воопшто немало зголемување (77). Правени се и опити со топлотен стрес, каде имало значително зголемување на БСК, но тоа било како последица на намалената млеко продукција која при топлотен стрес може да се намали за 10-20% (77). Еструсот како стрес не предизвикува значителни промени во БСК (18, 77). Различни типови на стресови незначително го зголемуваат БСК во не инфицираните четвртини, но значително го зголемуваат во инфицираните четвртини т.е. ја активираат/поспешуваат инфламацијата (77).

Бројот на соматските клетки е највисок во текот на летото (*јули/август*), а најнизок во зимата (18, 23, 76). Зголемувањето на температурата нема значително влијание врз БСК, бидејќи и кога температурата се користела како стресоген фактор не се добиени значителни зголемувања на БСК (18). Буневски Ѓ. (1996) во своите испитувања, најниска вредност на БСК кај источно-фризиската раса добил во јануари (141.111 кл/мл), додека највисока во јули (244.045 кл/мл), додека кај обриенталската раса најниски вредности добил во ноември (114.912 кл/мл), а највисоки во јуни (238.882 кл/мл) (81). Ваквата состојба се објаснува со зголемената температура и влажност која како последица има зголемен број на патогени М/О во околината на самата крава. Сето тоа резултира со зголемена контаминација на врвот од боските и зачестена појава на маститис (23, 76, 77).

2.5.4 Нормални варијации во бројот на соматските клетки

Потврдено е дека има нормални варијации на разредување на БСК во примероците на млеко кои се земени во различно време од молзењето и помеѓу молзењата (77). Бројот на соматските клетки, највисок е при домолзувањето или веднаш после

молзењето и ова ниво перзистира уште околу 4 часа (18, 75). Потоа постепено опаѓа до најниско ниво кое се јавува пред самото следно молзење (18, 77). Овие разлики во текот на самото молзење или магнитудата помеѓу најнискиот и највисокиот БСК во четвртината може да варира од 4-70 пати (23, 76, 77). Коефициентот на месечни варијации на БСК во стадото може да варира од 4-46% (18), додека коефициентот на дневните варијации на БСК по стадо е 24% (18, 75). Sharma N. et al. (2011) наведуваат дека дневната варијација може да варира и повеќе од 40% (23). Коефициентот на варијација по четвртина од иста крава во две последователни молзења може да флукутира и до приближно 30-35% (23, 76), додека тој коефициент во текот на целата лактација се движи од 59-301% (18).

2.5.5 Бројот на соматски клетки на ниво на стадо

Бројот на соматските клетки во стадото се индикатор на процентот на инфицираните четвртини во стадото (82). Во најразвиените млечни индустрии се применуваат различни регулаторни граници за млекото кое се користи за хумана употреба т.е. БСК на ниво на стадо. Во директивите на ЕУ, Нов Зеланд и Австралија таа граница е < 400.000 кл/мл, во САД < 750.000 кл/мл, Канада е < 500.000 кл/мл и Швајцарија до < 350.000 кл/мл.

Четрсто илјади соматски клетки на ниво на стадо се смета како гранична вредност за исправноста на млекото (23). Една крава во стадото со висок БСК може за 5-50% да го покачи БСК на целото стадо (74), додека просекот на БСК во стадото се зголемува како се зголемува и бројот на инфицирани четвртини (23). Во препораките дадени од National Mastitis Council (NMC) (2001) укажуваат дека доколку просекот на БСК во лактодризерот е < 200.000 кл/мл тогаш до 15% од кравите во стадото се инфицирани со една или повеќе четвртини, додека за секое зголемување на просекот на БСК во стадото за уште 100.000 кл/мл укажува на зголемување на инфекциите за 8-10%. Просек на БСК < 400.000 кл/мл, индицира инфицираност на една третина од кравите, додека пак просек < 700.000 кл/мл укажува на инфицираност на две третини на кравите во стадото (83).

Доста слични податоци наведуваат Sharif A. et al. (2008) кога просекот на БСК во стадото е 200.000 кл/мл кој е и мерна точка за маститисот, укажува дека се инфицирани

6% од четвртините во стадото, кога просекот е 500.000кл/мл, тоа укажува на инфизираност на 16% од четвртините, додека доколку просекот на соматските клетки во стадото е 1.000.000кл/мл, инфизираноста може да достигне до 32% (17).

2.5.6 Влијание на висок БСК врз количината и квалитетот на млекото

Субклиничкиот маститис е во директна корелација со физички, хемиски и бактериолошки промени во млекото и патолошка трансформација на самиот паренхим на МЖ (17, 76, 84, 85). Корелациите помеѓу составот на млекото и БСК се документирани од многу автори (17, 86, 85, 87).

Dohoo I. R. et al. (1982) наведуваат дека СМ резултира со зголемување на компонентите кои потекнуваат од крвта, а се намалува нивото на компонентите кој потекнуваат од МЖ, како последица на зголемена васкуларна пропустливост (17, 18, 87) и едемот на жлездениот паренхим (86).

Лактозата е важен составен дел на млекото, составена од две моносахаридни единици: гликоза и галактоза (17). Таа претставува главна осмотска детерминанта во млекото (86, 88, 89) нивото на лактозата во млекото се намалува или зголемува за да се одржи млекото во иста концентрација со крвта, бидејќи нивото на шеќерот во крвта не го менува нивото на лактозата во млекото, што не е својствено за останатите компоненти на млекото (17). Сепак, Ph на млекото е малку пониско од онаа на крвта (*т.е. повеќе кисел*): pH на крвта е 7.4, додека pH на млекото 6.7 (5). Субклиничкиот маститис т.е. зголемениот БСК е во негативната корелација со концентрацијата на лактозата во млекото (17, 76, 85, 87, 88, 93). Fernandes. A. M. et al. (2004) во истражувањето за влијанието на БСК врз концентрацијата на лактозата во млекото, го спровеле на две различни фарми, каде во првата фарма месечниот просек на БСК бил <500.000кл/мл, додека во втората фарма просекот на БСК бил >1.000.000 кл/мл. Тие во своето три месечно истражување добиле постепено намалување на концентрацијата на лактозата во млекото како се зголемувал БСК. Во првата фарма при месечниот просек на БСК од 143.000, 180.000 и 549.000кл/мл концентрацијата на лактозата била 4.56, 4.49 и 4.36%, додека во втората фарма при месечен просек на БСК од 2.330.000, 1.187.000 и 3.432.000кл/мл концентрацијата на лактоза била 4.31, 4.36 и 3.62% (85). Додека Klei. L. et al. (1998) при споредба на млеко со 83.000 и 870.000кл/мл констатирале намалување

на концентрацијата на лактозата од 4.98 на 4.71% (90). Бидејќи, под влијание на СМ концентрацијата на лактозата во млекото се намалува, тогаш концентрацијата на натриумот и хлоридот се зголемува со цел да се одржи осмотскиот притисок на млекото (76, 84, 88). Ова претставува една од причините за горчливиот и малку солен вкус на маститичното млеко (5).

Поголемиот дел од протеините во млекото се во форма на казеин, каде аминокиселините се пренесуваат до МЖ преку крвотекот и се трансформираат во казеин од страна на мамарните алвеоларни клетки, и од нив се екстрадира во млекото. Изненадувачки е дека енергетската содржина во исхраната има голем ефект на содржината на казеин во млекото. Додека протеините внесени преку храната имаат релативно мало влијание врз содржината на протеините во млекото. Другите типови на протеини присутни во млекото кои се во мали количини се албумините и глобулините кои се пренесуваат од крвта во млекото (5). Речиси сите автори се согласни дека во млекото со зголемување на БСК се зголемува или останува иста концентрацијата на севкупните протеини, но не и на казеинот, т.е. се намалува синтезата на казеинот, а се зголемува приливот на серумските протеини (*албумини и имуноглобулини*) (18, 86, 87, 88). Fernandes A. M. et al. (2007) наведуваат дека СМ може да предизвика намалување на концентрацијата на казеинот и/или зголемување на концентрацијата на серумските протеини во зависност од тежината на процесот (84). Покрај тоа, маститичното млеко содржи зголемено ниво на ендогениот ензим плазмин, кој се создава од неговиот прекурсор плазминоген. Неговата конверзија е поизразена во млекото со висок БСК (84, 88). Плазминот генерално го разложува казеинот во веќе складираното млеко на + 4° C, бидејќи тој не се уништува со самата постапка на пастеризација (5).

Млечните масти се формираат во секреторните клетки на МЖ кога масните киселини се комбинираат со глицеролот и конвертираат во неутрална форма на масти наречени триглицериди (5). Наодите за односот помеѓу мастите и БСК се контрадикторни. Fernandes A. M. et al. (2004) не добиле никаква корелација помеѓу БСК и концентрацијата на мастите, ниту кај кравите со висок, ниту кај кравите со низок БСК (32, 40, 85). Goncalves J. L. et al. (2018) правеле споредба на млекото помеѓу заразените и здравите четвртини од исти крави, каде установиле зголемена концентрација на мастите во млекото од четвртините инфицирани со контагиозни патогени М/О споредени со контралатералните здрави четвртини (91). Додека

негативна корелација помеѓу БСК и концентрацијата на мастите пријавиле неколку други автори (82, 86, 18).

Покрај ензимскиот плазмин, маститичното млеко исто така има зголемено ниво на липолитичкиот ензим липаза (88). Таа доведува до деградација на глобулите со млечна маст (5) изложувајќи ги на деградација со липопротеинската липаза во млекото, што доведува до повисоки нивоа на слободни масни киселини во млекото (76, 88). Затоа, зголемувањето на концентрацијата на млечна маст во млекото може да се објасни со намалување на млечниот принос, а не со намалена синтеза на масти, што укажува само на очигледно зголемување на концентрацијата на мастите (92).

Табела 1.: Промени во составот на млекото како последица на зголемување на БСК.

Состав на млеко	< 100	<250	500-1 000	> 1 000	БСК (10 ³ /ml) Причина за промена
Намалување (во g/100ml)					
Лактоза	4.90	4.74	4.60	4.21	Намалена синтеза
Казеин	2.81	2.79	2.65	2.25	
Масти	3.74	3.69	3.51	3.13	
Зголемување(во g/100ml)					
Бели протеини (Вкупно)	0.81	0.82	1.10	1.31	Истекуваат од крвта
Серум албумини	0.02	0.15	0.23	0.35	
Имуноглобулини	0.12	0.14	0.26	0.51	
Хлориди	0.091	0.096	0.121	0.147	
Натриум	0.057	0.062	0.091	0.105	
Калиум	0.173	0.180	0.135	0.157	
Ph	6.6	6.6	6.8	6.9	

Извор: Schallibaum, M. National Mastitis Council. Inc 40th Annual Meeting Proceedings 2001

Првично, намалениот принос на млеко од инфицираните четвртини е како последица на намалената синтеза на лактозата (89), која делува како растворувач и е одговорна за преминот од крвта во млекото, така да помала концентрација на лактоза води кон помал млечен принос (86). Секундарно, бактериските инфекции предизвикуваат оштетување на млечниот секреторен епител на МЖ и влијае на

свкупниот принос на млекото, каде ваквото оштетување некогаш може да резултира и со трајно губење на капацитетот на МЖ за синтеза на млеко (17, 88). Bezman D. et al. (2015) го истражувале ефектот од различни маститис патогени М/О врз млечниот принос споредувајќи ги инфицираните четвртини со контралатералните здрави четвртини на истата крава. Тие добиле 20% помалку принос на млеко во четвртините инфицирани со *Streptococcus dysgalactiae*, а 50% помалку принос на млеко од четвртините кои пред 1-2 месеци имале клинички маститис предизвикан од *Escherichia coli* (93). Иако, не била забележана значајна разлика во дневниот принос на млеко по крава, кој највероватно е поради компензацијата на другите четвртини, сепак квалитетот на млекото бил намален и при една инфицирана четвртина, каде БСК на свкупното млеко од кравата може да биде зголемен за >4 пати. Во однос на четвртините инфицирани со CoNS и контралатералните здрави четврти, Bezman D. et al. (2015) не добиле никаква разлика во приносот на млеко, освен зголемен БСК (93).

Различни автори во своите истражувања добиле слични или различни резултати за влијанието на СМ т.е. БСК врз продукцијата на млеко, но сите се согласни дека продукцијата на млеко е во негативна корелација со БСК (18, 76).

2.6 Влијание на хигиената на животните и хиперкератозата на крајот од боската врз БСК и ИМИ

Во текот на последните неколку децении примената на конкретни контролни програми за превенција и контрола на маститисот, резултирало со намалување на ИМИ предизвикано од контагиозните (*major* англ.) маститис патогени М/О (58, 94). Сепак, истовремено се зголемува инциденцата на маститис предизвикан од околинските маститис патогени М/О (76, 88, 95). Особено, кога *Escherichia coli* е причинител на маститисот, функционалноста на МЖ останува депресивна и по маститисот, што резултира со: намален принос, зголемен БСК и намален квалитет на млекото за производство на млечни производи, особено сирење (93), како и чести случаи на токсемија со сериозно пореметување на здравствената состојба, а не ретко и смртност (2).

Изложеноста на маститис патогените М/О и ефективността на одранбениот механизам се двата клучни фактори кој го одредуваат ризикот од ИМИ (96). Сепак

инциденцата на маститис предизвикан од околински патогени М/О се покажала како многу потешка за контрола (97). Тоа се должи на изворите на околинските патогени М/О каде вклучуваат почва, измет и постелка, сите присутни во системите за сместување на молзните крави, како и постоечката флора на кожата од боската (94, 96). Млечните крави, 40-65% од своето време го поминуваат во лежење, и бактериите можат да се пренесат од постелката на самите боски (94).

Еден контролен третман не се покажал дека е ефикасен во елиминирање на ИМИ од околинските извори (94, 98), па затоа се повеќе треба да се намалува изложеноста на боските према околината, како и степенот на хигиена во фармите да биде сведен на највисоко ниво (94). Хигиената може да се користи како индикатор за благосостојбата на животното (98). Лошата хигиена кај кравите е поврзана со зголемена појава на маститис предизвикан од околинските маститис патогени М/О (95). Кравите што имаат извалкани боски/МЖ, бараат поголеми напори во санитацијата на МЖ пред молзењето. Високиот процент на вакви крави може да влијае и на времето потрошено за молзење и потребата од квалификувани работници кои можат правилно да ја извршат процедурата на перење (6, 96). Во некои случаи сепак перењето на боските и не е неопходно, но може да ја зголеми количината на седимент во млекото и да влијае на квалитетот на млекото (95). Одредување на степенот на хигиенска чистота на различни делови од телото до некаде укажува и за хигиенската состојба во самата штала т.е. менаџерските практики (6, 96). Се смета дека чистотата на МЖ влијае врз квалитетот и типот на бактериите присутни на површината од боската и валканите боски се сметаат како извор на околински бактерии во млекото (98). Бројот на бактерии во млекото се зголемува кога боските се несоодветно исчистени и исушени, додека маститис патогените М/О присутни на крајот од боската се во корелација со појавувањето на ИМИ (96, 97).

Интегритетот на ткивото на крајот од боската околу самиот канал е важен фактор во отпорноста против бактериската колонизација на четвртините знаејќи дека каналот на боската претставува првична бариера во одбрана од маститис патогените М/О (97, 99). При правилни услови на молзење, како и кај нормална развиеност на МЖ може да се одржи соодветна рамнотежа помеѓу стапката на отстранување на кератинот за време на молзењето како и нејзиното регенерирање. Благата хиперкератоза на крајот од боската е нормален физиолошки одговор према силите наметнати од машинското молзење (98). Не соодветното управување со молзењето, како и апаратот за молзење

како фактор можат да доведат до промени на крајот од боската (*hyperceratosis*) (98, 99). Кравите кои имаат споро испуштање на млекото, висока продукција и голема разлика во продукцијата помеѓу предните и задните четвртини се повеќе склони кон хиперкератоза на крајот од боската (6). Neijenhuis F. et al. (2004) наведуваат дека има и зголемена хиперкератоза на крајот од боската при дезинфекција по молзењето, кое најверојатно е како последица на хемиската иритација од некои средства кои се користат за дезинфекција (19). Крајот на боската може да премине во груба површина на која може лесно да се населат и размножуваат бактериите (6), при што дезинфекцијата на боските пред и после молзењето е многу потешка и нејзината ефективност е намалена (100).

2.7 Антимикробна отпорност

Едно од најголемите достигнувања во историјата на медицината несомнено е откривањето на антибиотиците (101). Соодветната антибиотска терапија е од витално значење во лечењето на бактериските инфекции кај животните и луѓето. Антибиотската терапија го забрзува закрепнувањето на болните животни, ја подобрува благосостојбата на третираните животни, како и го спречува/намалува ширењето на инфекцијата на други животни или во случај на зооноза, и на луѓето (102, 103). Особено е важно што голем број на бактериски инфекции се фатални, предизвикуваат болка, како и ограничување на ефикасно производство на храна од животинско потекло (103). Кратко време по употребата на антибиотиците почнале да се појавуваат податоци за отпорноста на некој бактерии према одредени антибиотици. Во 1948 год. изолираните соеви на *S. aureus* од британските болници покажале отпорност према пеницилинот. Истата година, непосредно по првата употреба на лекот, забележана е отпорност према стрептомициниот од изолатите на *Mycobacterium tuberculosis*. Во 1960 год. утврдена е отпорност *S. aureus* према метицилинот (MRSA) и на *Enterococcus spp.* према ванкомицин (VRE) (101).

Светската здравствена организација (WHO) антимикробната отпорност ја дефинира како отпорност на микроорганизмот према антимикробниот лек каде првично бил ефикасен за лекување на инфекциите предизвикани од него. Антимикробната отпорност (АМО) претставува светски проблем како во ветеринарната така и во хуманата медицина (104, 105). Развојот на АМО кај животните

индиректно претставува опасност и за јавното здравје т.е. пренесувањето на АМО е наизменична, и од животни на луѓето и од луѓето на животните (104, 103, 106, 107). Дополнителна загриженост претставуваат заразените животни кога немаат видливи клинички симптоми, а една таква болест е и СМ (108). Преносот на резистентните бактерии најчесто е преку конзумирање на месо, млеко, продукти од животинско потекло, директен контакт со колонизираниите животни или ѓубриво распространето по животната средина (103, 106, 108). Пред сè работниците на фармите и кланиците, вклучително и ветеринарите имаат голем ризик да бидат колонизирани/заразени со отпорни бактерии преку директниот контакт со заразните/колонизираниите животни и храната произведена од овие животни. Понатаму, како такви да претставуваат канал за влез на отпорните бактерии/детерминанти во заедницата, болниците и животната средина (104). Кога резистентните бактерии се зоонози и можат да се пренесат преку контаминирана храна тие предизвикуваат директна закана према здравствениот статус на луѓето. Индиректно, кога бактериите не се зоонози, тие сеуште претставуваат опасност за луѓето кои ги внесуваат. Истите, може да бидат извор на генетски материјал за некој други бактерии што се патогени за човекот (107). Антимикробната отпорност, годишно предизвикува смрт на околу 700.000 луѓе, и се очекува тој број да се зголеми на 10 милиони годишно во 2050 год. (103, 106).

Антимикробната отпорност никогаш не би се развила кај животните доколку кај нив не се користат антимикробни лекови (103, 106). Најчеста причина за развој и ширењето на АМО е не соодветната употреба на антибиотици, интензитетот на употреба, постојана не контролирана употреба, субтерапевски дози и не намерна изложеност на луѓето на антимикробни резидуи во храната (млеко, месо, јајца) и околината (106, 107).

Бактериите можат да ги избегнат дејствијата на антибиотиците, користејќи разновидни механизми (104). Антимикробната отпорност кај бактериите може да биде: вродена и стекната (104, 109, 110).

- Вродената отпорност е генетски кодирана т.е. клеточните механизми потребни за осетливост према антибиотикот се отсутни во бактеријата. На пример, микоплазмите се отпорни на пеницилин поради отсутството на клеточен сид (105, 107, 109), или пак грам негативните бактерии се природно отпорни на ванкомицин, поради структурата

на нивниот клеточен сид, по што се разликува од клеточниот сид кај грам позитивните бактерии (104).

- Стекната резистенција се јавува поради: хромозомска мутација или примање на генетски материјал. Хромозомските мутации претставуваат случаен и бавен етапен процес каде доаѓа до промени на структурата на бактериската клетка, како последица на промена во секвенцата на ДНК. Преносливата плазмидна отпорност, како вид на примање на генетски материјал, е особено важна за ветеринарната медицина. Настанува одеднаш и предизвикува епидемиска или инфективна отпорност и тоа најчесто на неколку антибиотици одеднаш. Во овој случај, плазмидите кодираат синтеза на ензими што ги модифицираат антибиотиците. Плазмидната ДНК може да се репродуцира во клетката и да се пренесува на други клетки преку: трансдукција, конјугација и транспозиција (104, 107, 109):

1). Трансдукција е процес со кој плазмидната ДНК се инкорпорира во бактериофагот и потоа се пренесува на друга бактерија;

2). Конјугација е чест процес на трансфер на гени, бактеријата-донатор синтетизира секс пили со кој се поврзува со бактеријата-примател и во овој процес на парење копии на плазмидни гени се пренесуваат во примателот. Плазмидните гени за АМО остануваат во донаторот, а примателот станува исто така потенцијален донатор. Овој начин на пренос на АМО може да се случи не само кај видовите од ист вид, туку и помеѓу различни родови и фамилии на бактерии.

3). Транспозиција е процес при кој кратки ДНК-секвенци познати како транспозони (скокачки гени) може да се пренесуваат од плазмид на плазмид, плазмид на хромозом или хромозом на плазмид.

Отпорноста према антибиотиците, бактериите ја изведуваат преку повеќе различни механизми и тоа: **а)** ензимска инаktivација на антибиотиците; **б)** намалување на бактериската пермеабилност; **в)** промена на целните рецептори; **г)** развој на ензими со низок ефект према лековите; и **д)** отстранување на антимицробните лекови преку efflux-пумпите (107). Од клиничка гледна точка најголем проблем претставува хромозомската мутација на регионот кој ги контролира efflux системите каде се доведува до отпорност према повеќе антибиотици без нивна модификација. Efflux-пумпите ја намалуваат акумулацијата на соединенија (вклучувајќи различни

антимикробни лекови) бидејќи ги испумпуваат во периплазматскиот простор или директно во надворешниот медиум (104).

Употребата на антибиотиците кои се користат кај животните е скоро двојно поголема од онаа што се користи кај луѓето (103, 104). Поради сличностите помеѓу ветеринарните и хуманите антимикробни средства, лесно се доаѓа до вкрстена отпорност т.е. ист е механизмот на отпорност на ветеринарните и хуманите антибиотици (104). Во ветеринарната медицина антимикробните супстанции широко се употребуваат кај животните за терапија, профилакса и метафилакса, како и за унапредување во прирастот каде се даваат антибиотици континуирано во субтерапевски дози (101, 104, 105). Особено е истакната примената на антибиотиците при третман на КМ и СМ кај млечните крави бидејќи е воспоставена пракса во програмите за контрола на маститисот (111, 112).

Субклиничкиот маститис, пред се смета како проблем затоа што тој не се детектира на време и може континуирано да излучува резистентни бактерии во лактофризерот каде преку сировите млечни продукти може да се пренесе на луѓето (113, 114). Најрелевантни се отпорните бактерии што предизвикуваат маститис, како што се *S. aureus*, *CoNS* или и отпорните бактерии кои се присутни во околината на млечните крави како што се ентерококите. Ентерококите и *CoNS* иако имаат само ограничено клиничко значање во производството на млеко, но нивната убиквитарност и честото носење на гени за АМО е причина за загриженост (113).

Неминовна е строга контрола во користењето на антибиотиците со цел да се избегне брзата појава на АМО на новите антимикробни соединенија. Особено, зголемувањето на отпорноста може да дојде до степен каде повеќе антибиотикот не може да се користи како опција за третман кај молзните крави (што веќе тоа се гледа за *penicillin G*) (115).

Загриженоста за јавното здравје е од два аспекта и тоа: внесување на антимикробни остатоци и пренос на отпорни патогени М/О. Времето на повлекување на антибиотиците е наменето за спречување на антимикробни остатоци во млекото, месото и јајцата (106). Овој период треба строго да се контролира, затоа што прехранбените производи кои содржат антимикробни остатоци претставуваат главен резервоар кој може да придонесе за развој на АМО и кај луѓето (107, 112). Ризикот за луѓето, дополнително постои во ситуации кога сличен антимикробен препарат се

користи и кај животните и кај луѓето, или постои вкрстена отпорност помеѓу антимикробните средства што се користат во хуманата и ветеринарната медицина (106).

3. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО

Главна цел на ова истражување е да се одреди застапеноста на СМ и неговите причинители, према добиените податоци да се направи пресек за најдобрата алатка која може да се користи за утврдување на СМ на нашите фарми. Одредување на степенот на хигиена и оштетување на боските, како и нивно влијание како ризик фактор за појава на СМ и АМО на причинителите на СМ во малите краварски фаи во Р. С. Македонија.

Поконкретно, специфичните цели на истражувањето се:

1. Да се одреди застапеноста на СМ и идентификација на причинителите.
2. Да се одреди просек на бројот на соматски клетки (БСК) при појава на СМ.
3. Поврзаност или отсуството на БСК и ИМИ при утврдување на СМ.
4. Да се одреди алатка која може да се користи во утврдување на СМ на малите краварски фарми во Р. С. Македонија.
5. Да се испита влијанието на хигиената на телото и хиперкератоза на каналот од боската како ризик фактори врз инциденцата на СМ и БСК.
6. Да се одреди АМО на најчестите причинители на СМ.
7. Да се препорачаат соодветни мерки за контрола и ерадикација на СМ во Р. С. Македонија.

4. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

Истражувањето беше спроведено во период од април 2018 до март 2020 год., на 24 краварски фарми на различни локации на територијата на Р. С. Македонија. Средната големина на стадата беше 13 молзни крави, каде најмалата фарма имаше 4 крави, додека најголемата 51 крава во лактација. Истражувањето беше спроведено на 384 крави во лактација, прикажани во табела 2. Пресушените крави, јуниците и телињата не беа вклучени во вкупниот број на присутни грла на фармата. Сите фарми опфатени во ова истражување, беа со врзан систем на одгледување преку целата година. Испитуваните фарми користат ист начин на хранење, со исклучок на фарма бр.1 која за хранење на кравите користи автоматско хранење т.е со ТМР (totalmixedrotation). Од вкупно 24 краварски фарми, во 16 фарми хранењето и молзењето го прават самите сопственици, додека во останатите 7, и хранењето и молзењето е изведувано од страна на работници. Сите фарми користат органски материјал за простирка, пред се слама, многу мал број на фарми користат пилевина како простирка.

4.1 Практики при молзење

На сите фарми, се користи машинско молзење и кравите се молзат на истото место каде и се сместени. Во сите краварски фарми се применува двократно молзење (наутро и навечер) освен во една фарма (фарма бр.16) каде кравите се молзат трикратно. Како хигиенски практики при молзењето на фармите се применува чистење на МЖ пред молзење со топла вода, се користи иста крпа за сите крави. Бришењето т.е сушењето на МЖ беше со иста крпа за сите крави или воопшто не се сушеше МЖ. Само на две фарми (фарма бр. 12 и 21) се применува миеење на МЖ со вода под притисок, односно се пере цела МЖ и остава сама да се исуши. На други две фарми (фарма бр. 1 и 5) се применува потопување на боските после молзење во дезинфекционо средство и тоа не за време на целата лактација. Антибиотско пресушување на МЖ се применува само доколку има видливи промени на млекото од четвртината, или ако МЖ имала историја на КМ или намалена млеко продукцијата.

Табела 2.: Локација на фармата и број на молзни крави во нејзе

Ред бр на фарма	Место	Општина	Крави во лактација	Пресушени	Под антибиотик	Вкупно
1.	Петровец	Петровец	27	3		30/p
2.	Огњанци	Петровец	7	3		10
3.	Огњанци	Петровец	12	2	2	16
4.	Петровец	Петровец	12	1		13/p
5.	Делчево	Делчево	19	3	1	23/p
6.	Петралинци	Босилово	10	2		12
7.	Челопеци	Кичево	21	4		25/p
8.	Огњанци	Петровец	15	4	1	20
9.	Катланово	Петровец	9			9
10.	Бардовци	Карпош	14			14
11.	Ѓорче Петров	Ѓорче Петров	6	4		10
12.	Славеј	Кривогашта ни	26	6		32
13.	Лозово	Лозово	11	2		13
14.	Брвеница	Брвеница	16	1	1	18
15.	Петровец	Петровец	6	2		8/p
16.	Петровец	Петровец	6	2		8/p
17.	Петровец	Петровец	10			10
18.	Белчиште	Дебарца	17	4		21
19.	Мислешево	Струга	17	5		22
20.	Лесново	Злетово	30	4		34/p
21.	Карамани	Битола	51			51
22.	Долно Коњаре	Петровец	9			9
23.	Мислешево	Струга	4			4
24.	Равен	Гостивар	30	5		35
			384	57	5	

4.2 Идентификација на молзните крави

Сите крави, затекнати на фармата беа заведени во однос на ушната маркица и дополнително доделен интерен број. Староста т.е датумот на раѓање и податоците за расата на кравата беше земен од картонот за идентификација на говедото издаден од Агенцијата за храна и ветеринарство на Р. С. Македонија. Најзастапени раси од испитаните крави беа: Источно-фризиска раса со 63%, расата црвен-холштајн и симентал со 9% и расите браун-швиц и холштај-фризиец со 7%. Податоците за бројот на телења и периодот на лактацијата беа земени од млекопроизводителите. Просекот на отелување беше 2.8, додека опсегот на отелување се движеше од еднаш до петнаесет пати.

4.3 Собирање на моистри/примероци млеко

Примероците млеко без земени на ниво на четвртина, трикратно, во рок од 72 до 96 часа. Мострите беа земани пред самиот акт на молзење, независно од тоа дали се земени во текот на утринското или вечерното молзење. Примероците од млеко беа земени од 384 крави во лактација. За испитување на БСК беа земени 4.488 примероци на млеко, додека микробиолошкото испитување беше направено на 3.551 примерок на млеко. Примероци на млеко не беа земени од кравите до 10 дена по отелувањето и кравите кои биле третирани со антибиотици поради разни патолошки состојби до осмиот ден од апликација на антибиотикот. За истражувањето беа земани примероци на млеко од четвртина кај кои при адспекција и палпација не беа утврдени патолошки промени (*оток, болка, атрофија, апсцес*). Исто така, примероците беа земени доколку млекото беше без органолептички промени (*водесто, со згрутчувања или примеси на крв*).

Примероците за БСК и микробиолошко испитување беа земени истовремено од страна на едно лице според препораките зададени од NMC (2004) (116).

Пред земањето на примероците, боските беа механички исчистени со крпа за еднократна употреба, дезинфицирани со 10% раствор на Betadine и финално избришани, односно исушени. Од сите четвртини првите три до пет млаза на млеко беа отфрлени. За броене на соматските клетки, од секоја четвртина беше земено

најмалку 20мл млеко во пластични, стерилни туби од 50мл претходно обележани со интерен број и локација на четвртина (пл, пд, зл, зд).

За земање на примероци на млеко за микробиолошко испитување секоја боска беше дополнително детално дезинфицирана со вата потопена во 70% Ethanol, по редослед од поодалечните боски, кон поблиските во однос на лицето кое ги зема мострите. Во обратен редослед од секоја боска во стерилни туби од 15мл претходно обележани со истиот интерен број и локација на четвртината беа земени од 1 до 3 млаза на млеко. Земените примероци на млеко беа ставени во транспортен фрижидер на +4°C и транспортирани до Факултетот за Ветеринарна медицина-Скопје (ФВМС).

4.3.1 Бактериолошка изолација на примероците на млеко и утврдување на позитивните четвртини и крави

Изолацијата на причинителите на СМ беше извршена во Лабораторија за микробиологија при ФВМС. Примероците млеко веднаш беа засадувани на вештачки хранливи подлоги. Од секој примерок беше инокулирано по 0.01мл на крвен агар збогатен со 5% овча крв (Blood agar base-Biolife). Секоја плоча беше обележена со реден број, локација на четвртини и број на земање (пр. 34, ПЛ, II).

Инокулираните плочи беа инкубирани на +37°C, во аеробни услови и времетраење од 24-48 часа. По инкубацијата, на секоја плоча се правеше броење на колониите – *colony forming units (CFU)*. Притоа примероците беа класифицирани во четири групи и тоа : **а).** N-негативни, без раст, **б).** А со cfu > 5, **в)** В со cfu : 10-50 cfu и **г)** С > 50 cfu. (117, 118)

Од двете последователни земања на мострите се правеше морфолошка споредба на колониите. Примероците млеко каде беа утврдени морфолошки идентични колонии од двете последователни земања на млеко од истата четвртина беа класифицирани како позитивни. Во отсуство на изолирани бактерии од двете последователни земања, примероците беа класифицирани како негативни. Во спротивно, во сите други случаи каде не беа исполнети наведените критериуми, од соодветната четвртина повторно се земаше примерок (трикратно земање) (118).

Со цел да се добие чиста култура, добиените изолати од позитивните примероци беа пресадени на крвен агар збогатен со 5% овча крв (Blood agar base-Biolife), инкубирани на +37°C, во аеробни услови и времетрае од 24-48 часа.

4.3.2 Бактериолошка идентификација на бактериските причинители со примена на MALDI_TOF

Во идентификувањето на микроорганизмите, и за прв пат во ветеринарната медицина кај нас беше применета MALDI-TOF/SARAMIS™ платформа која овозможува брза идентификација на М/О пред се: бактерии, квасци, габи и спори.

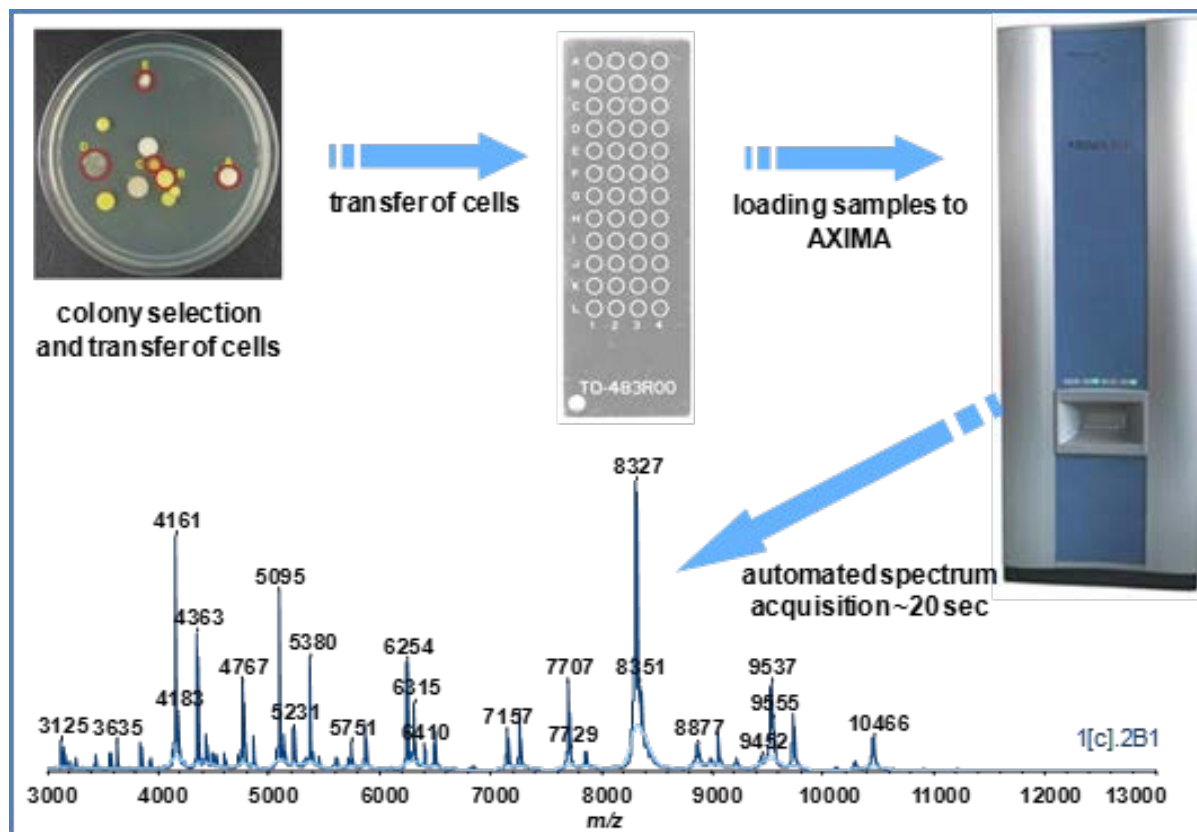
MALDI-TOF MS како дијагностичка алатка почнува интензивно да се применува од 1980год, каде првичната примена била намената во хуманата медицина, но последниве години со ист интензитет се користи и во ветеринарната медицина (121). Тој во својата анализа ги користи структурните рибозомални протеини кои се специфични за секој вид, каде не се под значително влијание од условите на животната средина или растот (121, 122). SARAMIS™ претставува софтвер/датабаза за автоматска идентификација на микроорганизми врз основа на нивниот спектар добиен со MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight) масен спектрофотометар. Оваа датабаза содржи спектри на патогени организми (човечки и животински), микроорганизми во храна и микроорганизми од различни природни живеалишта. Секој микроорганизам дава единствен спектар со специфични сигнали за видот, родот и фамилијата. Овие специфични сигнали се користат за автоматска идентификација на непознати микроорганизми. Листата на микроорганизми кои можат да се идентификуваат со SARAMIS е достапна на <http://www.anagnostec.eu/products-services/reference-databases.html>.

MALDI-TOF MS претставува брз, точен, лесен за употреба и евтин метод за идентификување на широк спектар на микробиолошки видови. Не бара посебно обучуван персонал и не зазема голем простор, користи многу мала количина од колонијата од примарната култура, а индиректно со неговата примена се намалува количината на отпад и штетите врз природата (123, 124). Mao-Cheng G. et al. (2016) во своето истражување констатирал дека со промена на конвенционалните методи за дијагностицирање на изолатите со MALDI-TOF MS цената за идентификување по

причинител се намалила за 2.29 пати, количината на биолошкиот отпад се намалил од 420 кг на 70кг/ по месец или 4.2 т / годишно помалку (123). Во истражувањето на Emily S. et al. (2017) каде правеле споредливост на четири различни дијагностички методи: ARIS (Automated Reading and Incubation System 2x System), API, MALDI-TOF MS и 16SrRNA. Тие констатирале дека само на MALDI-TOF MS му е потребно < 2ч за идентификување на изолатот и испитувањето чинело 2 долари, додека со останатите методи тоа чинело 7.80, 9.90-16.50 и 5.95 долари (125).

Постапката почнува со селектирање на колониите и нивен пренос на MALDI таргет. На MALDI таргетот, клетките се имобилизираат со додавање на 1 μ l матрикс (40 mg/ml α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) во вода/ацетонитрил/етанол (1:1:1) со 0.03% трифлуорооцетна киселина. Масените спектри се добиваат со користење на линеарниот начин на работа на MALDI-TOF масениот спектрофотометар со опсег m/z = 2.000 - 20.000. После обработката на спектрите, тие се внесуваа во SARAMIS софтверот. Во SARAMIS идентификацијата на непознатиот микроорганизам се вршеше врз база на споредба на неговиот спектар со спектрите на познати микроорганизми од дататазата (Слика 1).

Слика 1. Шематски приказ на идентификација на бактерии со корисрење на MALDI-TOF/SARAMIS™ платформа.



Овие анализи т.е. идентификацијата на бактериските причинители беа изработени во соработка со Истражувачкиот центар за генетско инженерство и биотехнологија ” Георги Д. Ефремов” при Македонската академија на науките и уметностите.

4.3.3 Утврдување на бројот на соматски клетки во млекото

Примероците млеко за броење на соматските клетки беа транспортирани до Лабораторијата за квалитет на сурово млеко при ФВМС, каде до постапката на нивното испитување беа чувани на +4°C. Пред да се започне со броење на соматските клетки, примероците беа загреани на температура од +40°C и во рок од 15 минути беа анализирани на апаратот Fossomatic 6000 (Foss Electric, Denmark). Процедурата за броење на БСК беше изведена во согласност со акредитираниот метод ISO17025-FVM-SOP-398 според ISO 13366-2:2006.

4.3.3 Класификација на млечните четвртини во однос на БСК и ИМИ

Во однос на БСК и микробиолошкиот наод по четвртина беа формирани четири различни групи. Целта на формирањето на групите беше да се комбинираат сите можни комбинации од БСК и микробиолошкиот наод по четвртина со цел да може да ја утврдиме интегрираноста на овие две дијагностички методи во правилно идентификување на СМ во четвртината. Во однос на БСК, четвртината беше прогласена за позитивна ако на две од трите испитани примероци БСК беше повеќе од 200.000 кл/мл.

Според критериумите во однос на микробиолошката изолација и БСК, четвртините ги класифицираме во четири групи, и тоа:

1. Група **V** : >200.000 кл/мл + со позитивен микробиолошки наод
2. Група **B** : <200.000 кл/мл + негативен микробиолошки наод
3. Група **N** : <200.000 кл/мл + со позитивен микробиолошки наод
4. Група **M** : >200.000 кл/мл + негативен микробиолошки наод

Ваквата класификација ја правиме со цел да ја утврдиме следливоста и/или интегрираноста на овие два теста, при прогласување на четвртината за позитивна или негативна на СМ.

4.4 Оценување на хигиена на телото

Оценувањето на хигиената на телото, како и оценување на хиперекзартозата на боските беше изведено на сите крави од кои беа земани примероци и сите оценувања беа изведени од исто лице.

Хигиената на телото беше оценувана при дневна светлина во истиот период кога се земаа млечните примероци. Се оценуваа пет различни области на телото: слабина, бут, млечно огледало на МЖ, латералните страни на МЖ и нозете дистално од колената (6). Истражувачите користат различни класификации за оценување на хигиенската оцена на телото. Во ова истражување беа следени препораките на Schreiner D. A. et al. (2003) и Sant'Anna A. C. et al. (2011), односно беше користен четири степен систем на оценување на хигиената на телото и тоа:

- 1:** целата област е чиста, без наслаги на нечистотија
- 2:** областа е малку валкана или извалкана помалку од половина
- 3:** повеќе од половина област е прекриена со слој на нечистотија
- 4:** целата област е покриена со слој на нечистотија (95, 96).

Истиот систем на оценување се користеше при анализирање на сите области. Се оценуваа областите на телото од двете страни и за релевантна оцена секогаш се земаше повисоко добиената оцена.

4.5 Оценување на степенот на хиперкератоза на каналот од боцката

Оценување на степенот на хиперкератозата беше изведено на секоја четвртина, пред самиот акт на молзење. Четвртините кои беа пресушени не беа оценувани. Користевме четири степен систем на оценување према препораките од Marcela de PinhoManzi et al. (2012) и Sandrucci A. et al (2014):

- 1. (N):** без прстен, мазен крај, па дури и со мал отвор;
- 2. (S):** подигнат прстен без грубост или само со слаба грубост околу самиот отвор, но без кератински пролиферации;
- 3. (R):** груб подигнат прстен, со примеси на кератин кој проминираат од 1-3мм од отворот на боската;
- 4. (VR):** многу груб прстен со кератин кој проминира повеќе од 4мм од отворот на боската (119, 120)

4.6 Утврдување на АМО кај најраспространетите причинители на маститис

Антимикробна отпорност беше направена на три различни причинители на СМ и тоа: *Staphylococcus aureus*, *Escherihia coli* и *Streptococcus agalactiae*. Изборот на изолати од веќе наведените причинители беше од секоја крава по еден изолат т.е. доколку кравата има инфицирано само една четвртина со еден од наведените причинители тој беше тестиран на АМО, доколку има инфицирани повеќе од една

четвртина, тогаш по случаен избор беше одбран само еден изолат кој преставува и репрезент на ниво на крава. Свкупно беа испитани 43 изолати од кој: 25 изолати (25 крави) на *S. aureus* кои потекнуваат од 12 фарми, 6 изолати на *E. coli* кои потекнуваат од 4 фарми и 12 изолати на *S. agalactiae* кои потекнуваат од 2 фарми. Испитувањето на АМО на изолатите беше направено со примена на комерцијални Sensititre™ CMV1AMAF плочи, дизајнирани за детекција на АМО кај грам позитивни и грам негативни бактерии кои предизвикуваат маститис кај кравите, на десет антибиотици во различни концентрации по препораките од производителот. Анимикробната отпорност беше испитувана кон: *Ampicilin* (AMP), *Penicilin* (PEN), *Erytromycin* (ERY), *Oxacilin* +2%NaCl (OXA+), *Pirlamycin* (PIRL), *Penicilin/Novobiocin* (P/N), *Tetracycline* (TET), *Cephalothin* (CEP), *Ceftiofur* (XNL) и *Sulphadimethoxine* (SDM).

Накратко, 3-5 колонии од чиста култура беа суспензирани во стерилна дестилирана вода до постигнување на 0.5 McFarland. Густината на суспензијата се мереше со помош на денситометар. По направената суспензија, по 30µl се суспензираа во Mueller-Hinton бујон (Oxoid). Од вака направената суспензија, по 50 µl беа инакулирани во секое базенче од плочата, каде предходно од самиот производител се означени локациите и концентрациите на десетте различни антибиотици. Според комерцијалниот формат на плочата, на една плоча може да се нанесат по два изолати. Од позитивната контрола од плочата се инакулираше по 10 µl на вештачка хранителна подлога (триптоза соја агар) со цел да се утврди присуство на чиста култура. Секоја плоча беше инкубирана на 37°C во времетраење од 24ч. По инкубација, плочите беа мануелно читани за присуство на раст на колонии во инокулираните базенчиња и беше одредена минималната инхибиторна концентрација по антибиотик на секој од испитуваните причинители.

Интерпретацијата на добиените резултати беше изведена според стандардот зададен од CLSI и EUCAST (126, 127).

4.7 Статистичка анализа

Анализата на податоците беше направена на три нивоа и тоа на ниво на испитани четвртини, испитани крави/млечни жлезди и ниво на фарми вклучени во студијата. Дескриптивната статистика беше претставена преку апсолутни вредности на податоците, проценти, а БСК во одредени анализи беше прикажан преку декадна логаритамска трансформација. Како мерки на централна тенденција на сетовите податоци се употреби просек (аритметичка средина) пропратен со стандардна девијација (SD) и медијана со 25%-75%, интерквартален опсег (Q1-Q3), а дополнително и приказ на опсегот на податоци (минимум–максимум).

Дескриптивната статистика се употреби и за да се направат поедини анализи и извечат заклучоци. Така, беше направен преглед на просечниот БСК за сите изолирани причинители на ниво на четвртина и преку дескриптивна статистика прикажан БСК. Базирајќи се на прегледот беше утврден минималниот БСК каде е изолиран причинител, а направени се и други анализи на поврзаност помеѓу БСК и причинителот, како на пример процент на причинители од вкупно изолираните кај кои беше утврден понизок број од 200.000 кл/мл. Дополнително, на база на категоризацијата на примерокот во зависност од CFU беше направена и споредба од првото, второто и третото земање наспроти финално прогласениот микробиолошки резултат за четвртината. Секое земање беше означено со една буква (категорија) така што три букви означуваат три земања почнувајќи од лево кон десно. Беше одредена фреквенција на секоја комбинација на букви наспроти класификацијата на микробиолошки позитивна или негативна четвртина. На овој начин се утврди законитост во однос на потребниот број земања примероци за да се констатира финален микробиолошки статус на испитуваната четвртина. Застапеноста на СМ, степенот на оштетувања на боските и нивната распределба според оштетувањата, класификацијата и прегледот на микробиолошките видови т.е. изолирани бактерии беа дополнителни параметри кои во студијата беа дескриптивно прикажани.

Разликите помеѓу групите и тестирањето на поставените хипотези во студијата беа изведени со неколку тестови во зависност од видот и достапноста на податоците. Така *Pearson* Хи квадрат тестот се користеше за да се утврди: **1)** улогата на локацијата на четвртината врз нејзиниот маститис статус (ИМИ и БСК) преку застапеноста на одреден маститис статус кај различно лоцираните четвртини; **2)** најбројните бактерии,

т.е. оние изолирани 5 пати од секоја четвртина беа споредени помеѓу себе со цел да се утврди дали некоја од овие бактерии има повисок афинитет кон поедина четвртина од млечната жлезда; 3) улогата на оштетеноста на боските во присуството на одредена бактерија преку споредба помеѓу застапеноста на сите изолирани видови бактерии помеѓу различните оштетувања на боските, како и 4) евентуална поврзаност на четирите најзастапени видови бактерии во студијата со оштетувањата на боските. Употребата на прилагодени резидуали во Хи квадрат тестот ќе се употреби за да се утврди застапеноста на најчестите бактерии изолирани во различните четвртини од МЖ, поточно нивната доминација во поедина четвртина, како и да се утврди евентуалната значајна доминација на најбројните бактерии преку нивниот број на изолати во поедина четвртина. Застапеноста на бактериските изолати кај различниот степен на оштетување на боските беа анализирани со користење на *Fisher exact test*. Поврзаноста на висината на МЖ (под и над скочниот зглоб) и БСК во примероците беше тестиран со користење на *Mann-Whitney U Test* на независни примероци. Анализите во кои учествуваат повеќе од две групи во дата сетот во студијата, вклучија *Kruskal-Wallis test* со рангирање при утврдување на доминација на бројот на изолати од поедина бактерија за одредена четвртина од МЖ, а за потврда, истиот тест ќе се повтори и по отстранување на утврдените коинфекции. Овој тест беше искористен за потврдување на хипотезата дека БСК се разликува кај боските со различен степен на оштетување. Параметарскиот *One Way ANOVA* со *Tukey HSD post-hoc* тест се употреби при утврдување на евентуални разлики и поврзаност помеѓу просечниот БСК со: 1) различните класификациски групи на СМ; 2) најчесто изолираните причинители; и 3) чистотата на поедини регии од телото. Во контекст на чистотата на телото беше применета *Spearman Rank* корелација за да се потврди поврзаноста помеѓу БСК и хигиената на телото. При сите применети тестови и анализи нивото на значајност за прифаќање на алтернативната хипотеза (X_1) беше поставено на $p < 0.05$.

За анализата и обработката на податоците ќе се користи Microsoft Excel (2010) и Statistica 8.0 (StatSoft, Inc, 2008).

5. РЕЗУЛТАТИ

Во студијата беа вклучени 384 молзни крави од 24 краварски фарми чија медијана изнесуваше 13 крави/фарма, во опсег од 4 до 51 крава. Од вкупно испитаните крави 284 (74 %) беа прогласени со позитивен статус на СМ, и 100 крави (26 %) беа со негативен статус. Испитани беа вкупно 1.496 различни четвртини и тоа 376 ПД, 373 ПЛ, 371 ЗД и 376 ЗЛ. Според микробиолошкото испитување на 1.496 четвртини, 66,0% беа прогласени со негативен, додека 33,6% беа со позитивен микробиолошки наод, а 0,4% беа четвртини со клинички маститис.

До ниво на вид на микроорганизам беа идентификувани 50 различни видови, односно 458 изолати (86,58% од изолатите); до ниво на род (spp.) беа идентификувани 2 различни рода (*Streptococcus* и *Corynebacterium*), односно 6 изолати (1,13% од изолатите) и недиференцирани беа 65 изолати (12,29 % од изолатите). Изолираните микроорганизми од пробите млеко во оваа студија се прикажани во Табела: 3

Табела 3.:Изолирани микроорганизми од мострите млеко

Вид на микроорганизам	Бр. на изолати	Процент од изолираните
CoNS	123	23.25
<i>Streptococcus uberis</i>	83	15.69
ND	65	12.29
<i>Staphylococcus aureus</i>	45	8.51
<i>Streptococcus agalactiae</i>	45	8.51
<i>Lactococcus lactis</i>	26	4.91
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	23	4.35
<i>Enterococcus faecalis</i>	16	3.02
<i>Aerococcus viridans</i>	15	2.84
<i>Escherichia coli</i>	8	1.51
<i>Lactococcus garvieae</i>	7	1.32
<i>Corynebacterium renale</i>	6	1.13
<i>Aerococcus urinaequi</i>	5	0.95
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	5	0.95
<i>Corynebacterium</i> spp.	5	0.95
<i>Bacillus cereus</i>	4	0.76
<i>Streptococcus lutetiensis</i>	4	0.76
<i>Streptococcus canis</i>	3	0.57
<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	3	0.57
<i>Acinobacter johnsonii</i>	2	0.38
<i>Corynebacterium xerosis</i>	2	0.38

Micrococcus luteus	2	0.38
Streptococcus bovis/equinus	2	0.38
Aeromonas hydrophila	1	0.19
Arcanobacterium pyogenes	1	0.19
Arhanobacterium pyogenes	1	0.19
Citrobacter braakii	1	0.19
Corynebacterium mucafaciens	1	0.19
Corynebacterium stationis	1	0.19
Corynebacterium striatum	1	0.19
enterococcus pseudoavium	1	0.19
enterococcus avium	1	0.19
enterococcus avium/raffinosis	1	0.19
Enterococcus faecium	1	0.19
Globicatella sanguinis	1	0.19
jeotgalicoccus marinus	1	0.19
kluyveromyces marxianus	1	0.19
Micrococcus lylae	1	0.19
Micrococcus tereus	1	0.19
Parvibaculum lavamentivorans	1	0.19
Pseudomonas aeruginosa	1	0.19
Raoultella ornithinolytica	1	0.19
Rothia nasimurium	1	0.19
Rothia kristinae	1	0.19
Serratia marcescens	1	0.19
Streptococcus gallolyticus/macedonicus	1	0.19
Streptococcus ictaluri	1	0.19
streptococcus parauberis	1	0.19
streptococcus spp.	1	0.19
Streptococcus sanguinis	1	0.19
Streptococcus thoraltensis	1	0.19
weissella cibaria	1	0.19
Weissella paramesenteroides 2	1	0.19
Вкупно:	529	100

ND - не е диференцирана (идентификувана)

Во Табела 3, прикажани се сите изолирани бактерии што беа идентификувани при изолацијата, додека различните видови на *CoNS* се групирани во една група.

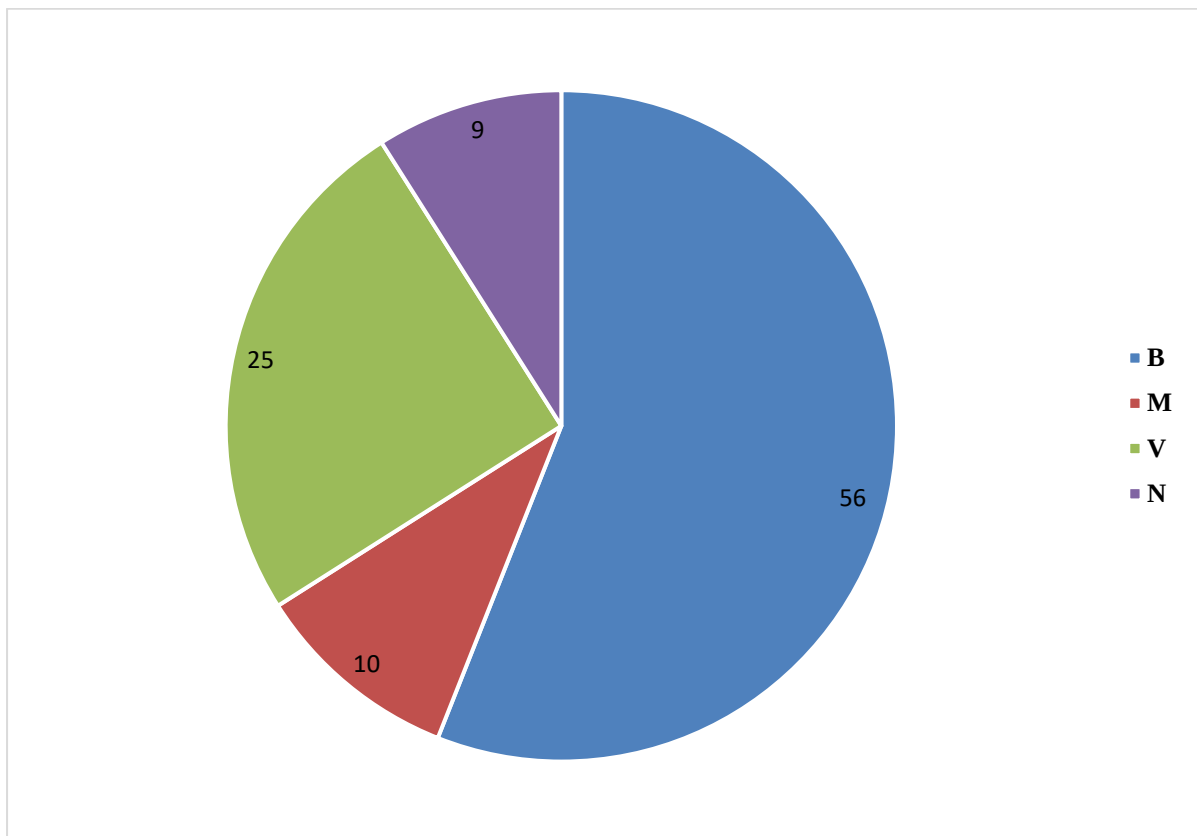
Табела: 4.:Застапеност на видовите од групата *CoNS*, идентификувани во изолатите од примероците млеко во студијата

Вид бактерија	Број на изолати	Процент од изолираните <i>CoNS</i>
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	49	40.83
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	17	14.17
<i>Staphylococcus simulans</i>	11	9.17
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12	10.0
<i>Staphylococcus rostra</i>	5	4.17
<i>Staphylococcus hyicus</i>	3	2.50
<i>staphylococcus hominis</i>	3	2.50
<i>Staphylococcus warneri</i>	2	1.67
<i>staphylococcus cohnii</i>	2	1.67
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> + <i>aerococcus viridians</i>	1	0.83
<i>Staphylococcus epidermidis</i> + <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1	0.83
<i>Staphylococcus xylosus</i>	1	0.83
<i>Staphylococcus succinus</i>	1	0.83
<i>staphylococcus rostri</i> + <i>staphylococcus nepalensis</i>	1	0.83
<i>Aerococcus viridans</i> + <i>staphylococcus nepalensis</i>	1	0.83
<i>staphylococcus saprophyticus</i>	1	0.83
<i>Streptococcus uberis</i> + <i>Staphylococcus simulans</i>	1	0.83
<i>Staphylococcus lentus</i>	1	0.83
<i>Staphylococcus equorum</i>	1	0.83
<i>Staphylococcus rostri</i> + <i>Staphylococcus nepalensis</i>	1	0.83
<i>Aerococcus viridans</i> + <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1	0.83
<i>Staphylococcus rostri</i> + <i>Streptococcus uberis</i>	1	0.83
<i>Bacillus pumilus</i> + <i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	0.83
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> + <i>Enterobacter cloacae</i>	1	0.83
<i>Stapylococcus delphini</i>	1	0.83

Во Табела 4. Се прикажани сите утврдени видови на *CoNS*, каде 15 видови се изолирани во чиста култура, додека во 10 четвртини се изолирани по два причинители каде во 3 случаи и двата изолати се од групата *CoNS*, додека во останатите 7 четвртини се мешана инфекција.

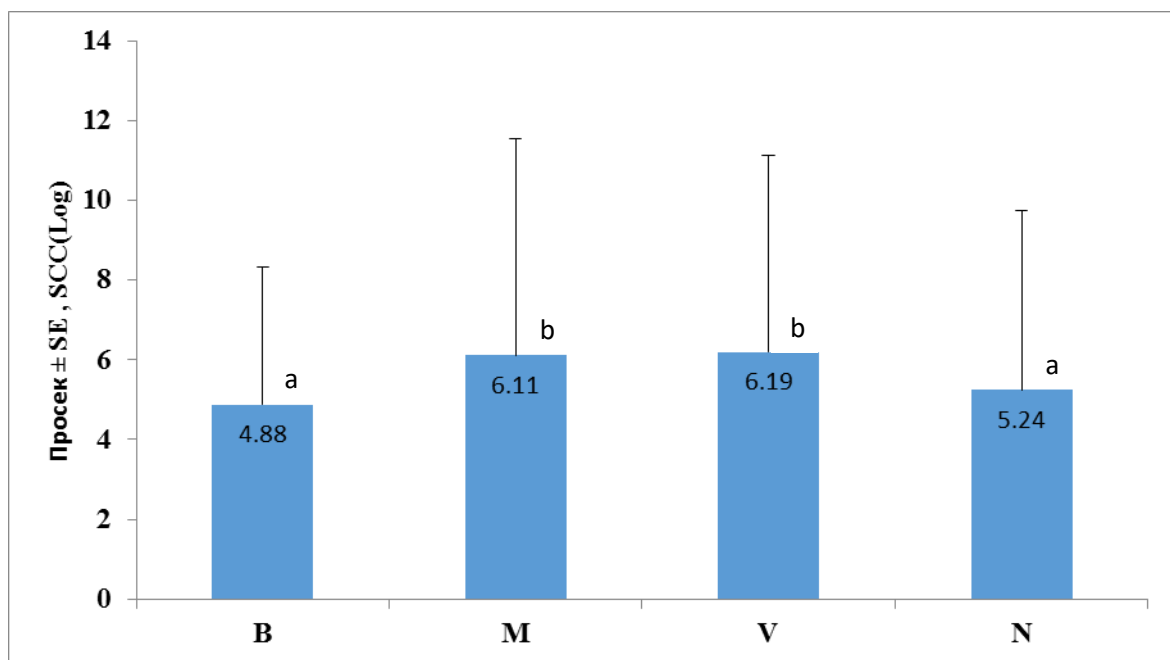
Просечниот БСК од сите испитани крави во студијата изнесуваше $603 \times 10^3 \pm 980 \times 10^3$ движејќи се во опсег од 8 до 8.908×10^3 кл/мл.

Графикон бр.1: Процент од испитани четвртини (n=1.490) класифицирани според микробиолошкиот наод и БСК: **V** = БСК > 200x10³ и бактериолошки изолиран причинител; **B** = БСК < 200x10³ и без наод на бактериолошки изолиран причинител; **N** = БСК < 200x10³ и бактериолошки изолиран причинител; **M** = БСК > 200x10³ и без наод на бактериолошки изолиран причинител.



Графикон бр. 2: Број на соматски клетки во млекото (Просек $\pm$ SE, како log вредности) според класификациските групи на СМ во четвртините (**V** = БСК $> 200 \times 10^3$ и бактериолошки изолиран причинител; **B** = БСК $< 200 \times 10^3$ и без наод на бактериолошки изолиран причинител; **N** = БСК $< 200 \times 10^3$ и бактериолошки изолиран причинител; **M** = БСК $> 200 \times 10^3$ и без наод на бактериолошки изолиран причинител.). Различните букви помеѓу групите укажуваат на значајни разлики во БСК помеѓу групите, $p < 0.001$.

Графикон бр. 2



Утврдена е значајна разлика помеѓу класификациските групи на СМ во однос на БСК, $F(1,3) = 128.45$, $p < 0.001$ и тоа помеѓу групите V, M со групите N, B ($p < 0.001$), но не се детектира значајна разлика помеѓу V и M ($p = 0.19$), како и помеѓу N и B ($p = 0.86$). Тоа укажува дека не може да се направи јасна дистинкција помеѓу групите со и без детектиран причинител како во групите со $> 200 \times 10^3$ БСК така и помеѓу групите со и без причинител што имаат $< 200 \times 10^3$ БСК.

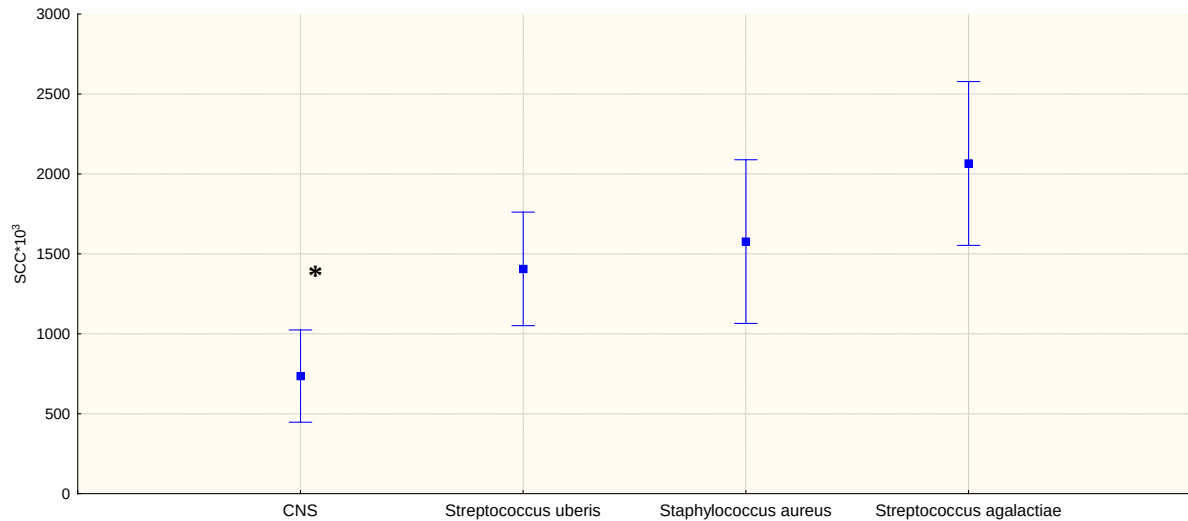
Табела бр. 5: БСК*10³ во четвртините од каде се изолирани бактерии

Микроорганизам	Бр. на изолати	Просек	SD	Минимум	Максимум
CoNS	120	735	1180	21	6086
Streptococcus uberis	78	1424	1596	15	7561
ND	61	1186	1220	122	6153
Staphylococcus aureus	38	1577	1716	43	7655
Streptococcus agalactiae	36	2180	2480	44	10374
Lactococcus lactis	25	1482	2228	86	9529
streptococcus dysgalactiae	21	1417	1061	26	3695
enterococcus faecalis	16	1021	1484	80	5760
Aerococcus viridians	10	805	637	187	2185
Escherichia coli	8	2564	2988	146	9118
Corynebacterium renale	6	365	375	45	1057
lactococcus garvieae	6	469	526	106	1527
Aerococcus urinaeequi	5	78	97	15	248
streptococcus lutetiensis	4	781	1149	54	2482
Streptococcus gallolyticus	4	1762	1133	452	2975
Corynebacterium spp.	3	305	231	68	530
streptococcus mitis/oralis	3	499	304	320	851
Streptococcus canis	3	755	618	92	1315
Corynebacterium spp.	2	160	190	26	295
Bacillus cereus	2	176	34	152	200
corynebacterium xerosis	2	201	1	200	202
Streptococcus bovis/equinus	2	231	19	218	244
Micrococcus luteus	2	355	476	18	691
Acinobacter johnsonii	2	567	532	191	943
Staphylococcus aureus + Bacillus cereus	2	2546	3443	111	4981
streptococcus spp.	1	52		52	52
Citrobacter braakii	1	53		53	53
jeotgalicoccus marinus	1	70		70	70
Lactococcus garviae + Rothia kristinae	1	95		95	95
enterococcus pseudoavium	1	126		126	126
Streptococcus agalactiae + Streptococcus thoraltensis	1	131		131	131
Streptococcus agalactiae + CNS	1	136		136	136
Streptococcus agalactiae + Aerococcus viridians	1	141		141	141
CNS + Weissella paramesenteroides 2	1	186		186	186
streptococcus parauberis	1	192		192	192
Streptococcus uberis + CNS	1	250		250	250
Micrococcus tereus	1	260		260	260
weissella cibaria	1	267		267	267
Enterococcus faecium	1	273		273	273
Aeromonas hydrophila	1	328		328	328

Streptococcus agalactiae + corynebacterium mucafaciens	1	349		349	349
ND + Globicatella sanguinis	1	399		399	399
kluuveromyces marxianus	1	461		461	461
Parvibaculum lavamentivorans	1	627		627	627
Streptococcus uberis + staphylococcus aureus	1	680		680	680
Micrococcus lylae	1	859		859	859
streptococcus uberis + streptococcus sanquinis	1	884		884	884
Arhanobacterium pyogenes	1	942		942	942
Staphylococcus aureus + Streptococcus galololyticus	1	1050		1050	1050
Streptococcus dysgalactiae + ND	1	1336		1336	1336
enterococcus avium	1	1424		1424	1424
Streptococcus ictaluri	1	1461		1461	1461
Aerococcus viridans + Lactococcus lactis	1	1606		1606	1606
Streptococcus agalactiae + Staphylococcus aureus + Streptococcus uberis	1	1715		1715	1715
Staphylococcus aureus + Streptococcus agalactiae	1	1719		1719	1719
Streptococcus gallolyticus/macedonicus	1	1944		1944	1944
Corynebacterium striatum	1	2023		2023	2023
Aerococcus viridans + ND	1	2188		2188	2188
Pseudomonas aeruginosa + Corynebacterium stationis	1	2470		2470	2470
Rothia nasimurium	1	2679		2679	2679
enterococcus avium/raffinosis	1	2746		2746	2746
Staphylococcus aureus + Aerococcus viridians	1	3326		3326	3326
Aerococcus viridans + Streptococcus dysgalactiae	1	3591		3591	3591
Raoultella ornithinolytica	1	5082		5082	5082
Serratia marcescens	1	5622		5622	5622
Сите причинители	501	1129	1170	15	10374

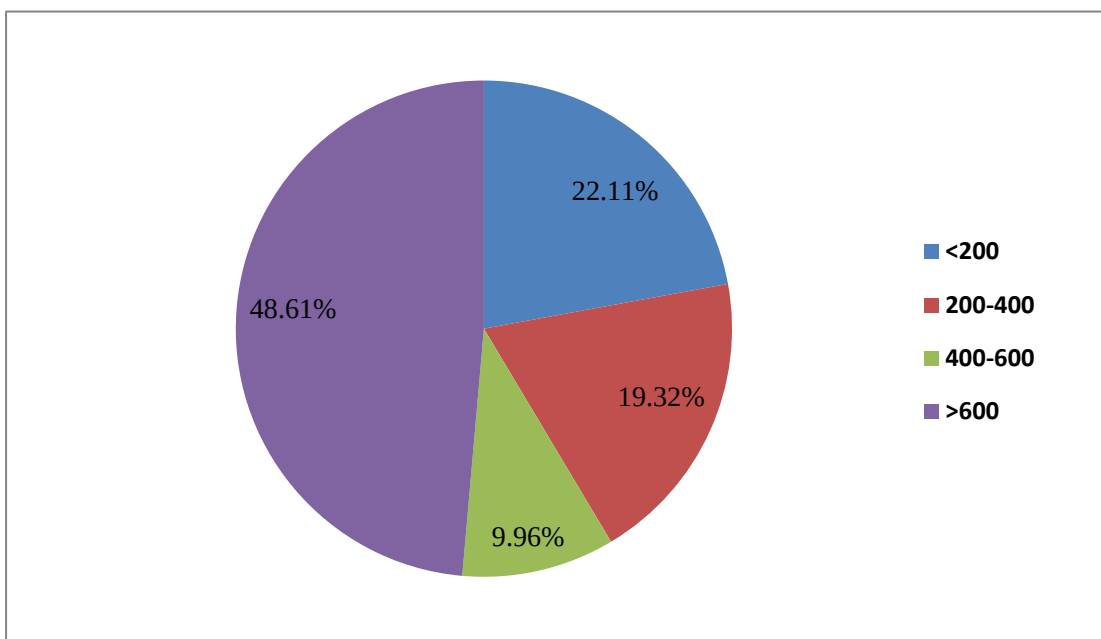
Во табела. 5: прикажан е БСК во четвртините од каде е изолиран одреден причинител/бактерија. Минималниот просечен БСК каде е изолиран причинител е $15 \cdot 10^3$ кл/мл кај *Aerococcus urinaeequi*, а максималниот изнесува $10.374 \cdot 10^3$ кл/мл кај *Streptococcus agalactiae*. Кај 13 изолирани причинители (20%) од вкупно изолираните 65 имале минимален просечен број на БСК $<200 \cdot 10^3$, од кои пак 5 биле ко-инфекции, а од 8 се изолирани само по еден причинител. Додека 31 изолат со изолирани причинители (47,69%) имале наод на БСК $<200 \cdot 10^3$. Кај најчесто изолираните бактерии просечниот БСК значително е понизок кај *CoNS* (735 ± 146) во однос на другите најчести бактерии од $1.406 - 2.065 \cdot 10^3$, $F(3, 271) = 8.15$, $p < 0.001$,

Графикон бр.3: БСК (Просек $\pm$ CI95) во четвртините каде се изолирани најчестите бактерии во студијата * $p<0.001$



Во четвртините каде имаше утврден микробиолошки наод, БСК се движеше од 15×10^3 до 10.374×10^3 со просечна вредност на БСК од $11.975 \times 10^3 \pm 1.573 \times 10^3$.

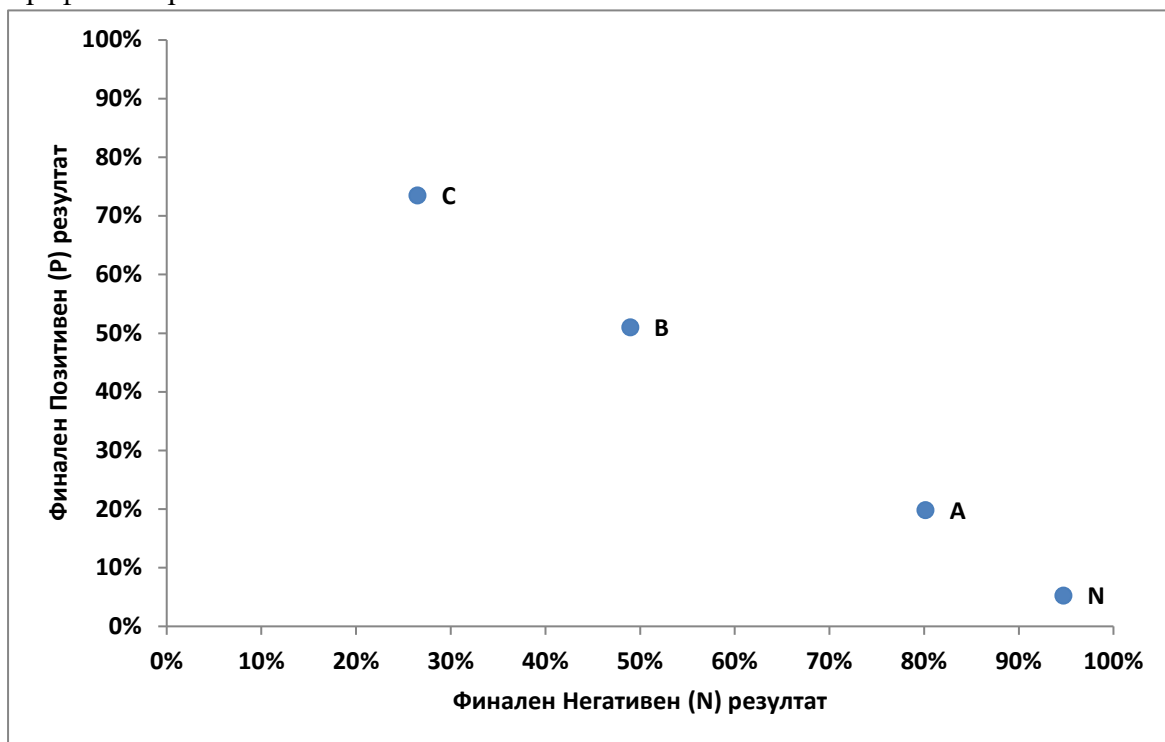
Графикон бр.4: Дистрибуцијата на бројот на четвртини со изолати според БСК.



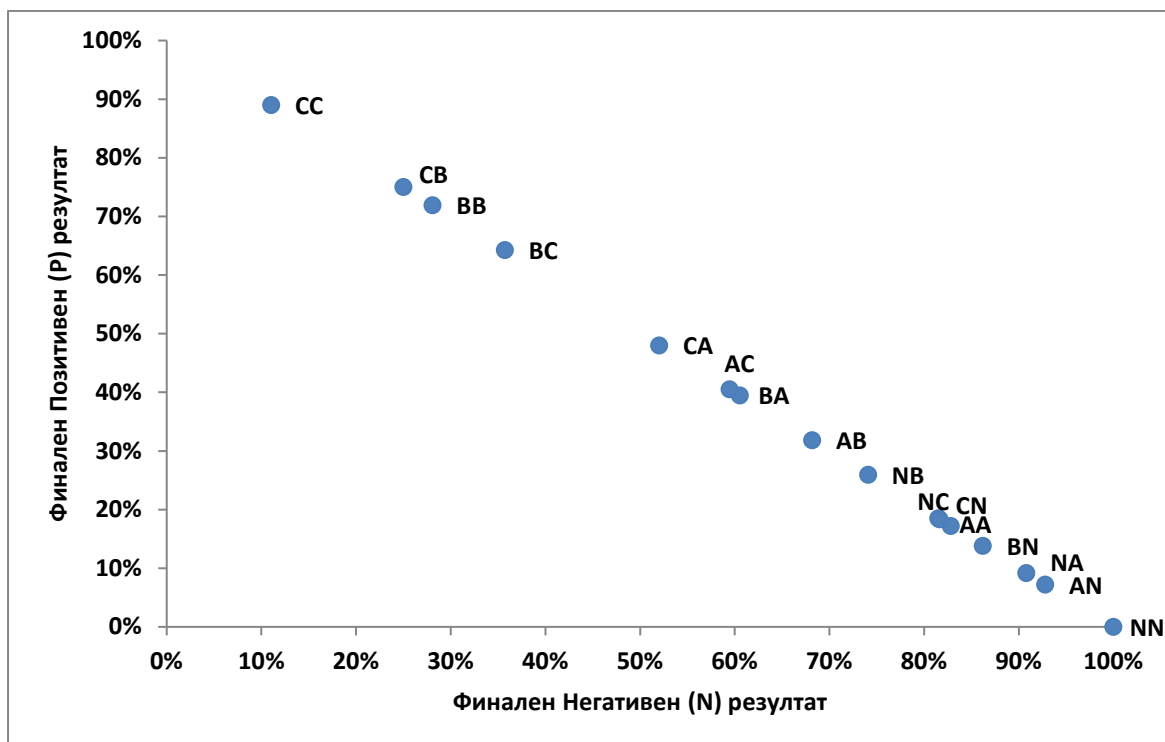
На графиконот бр.4 прикажана е процентуална застапеност на четвртините од сите четвртини со микробиолошки наод во однос на вкупниот БСК (прикажани како $\text{БСК} \cdot 10^3$).

Во однос на бројот на земени примероци и споредба со финалниот микробиолошки статус на четвртината се утврди дека со само еднаш земени примероци, 95% од примероците што се прогласени како **N** (негативен наод) се исто така класифицирани како **N** и во финалниот микробиолошки наод (по три мострирања). Од друга страна 74% од примероците што при првото тестирање се класифицираа како **C** ($>50 \text{ CFU}$) исто така беа класифицирани и по трите мострирања. Подеталните резултати од класификациите на примероците според бројот на мострирања и нивната споредба со финалниот резултат се прикажани на Графиконите со бр: 5A, 5Б и 5B.

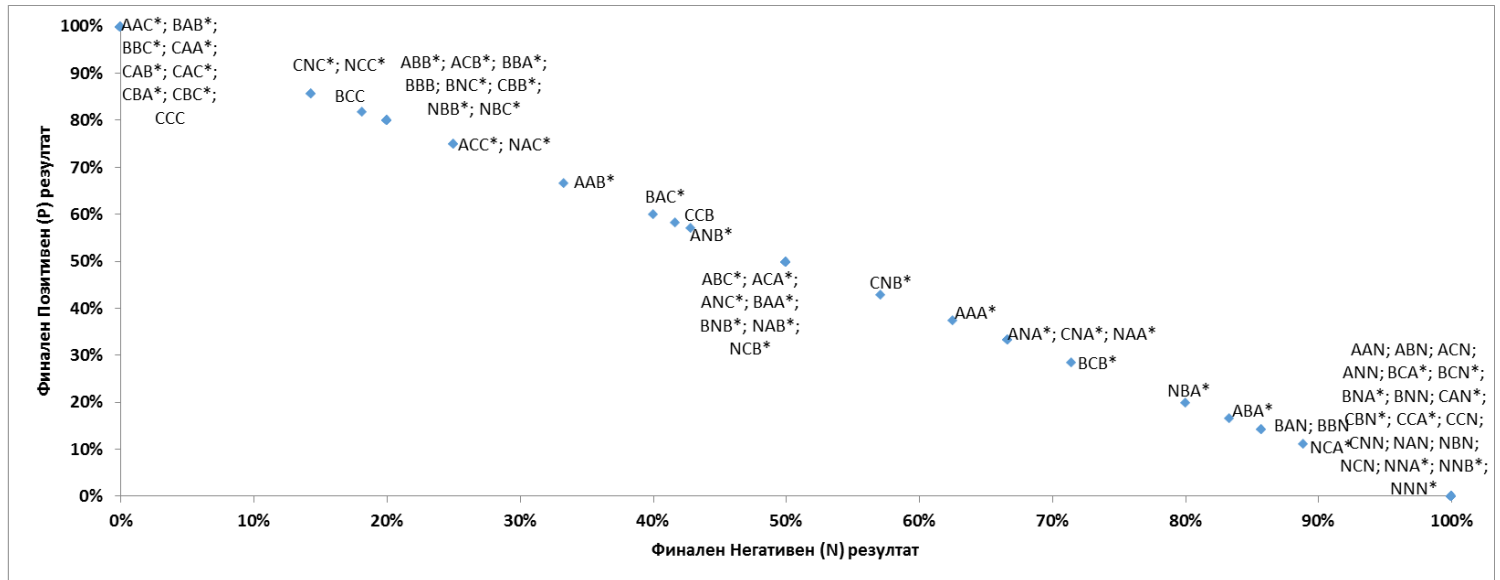
Графикон бр. 5А



Графикон бр. 5Б



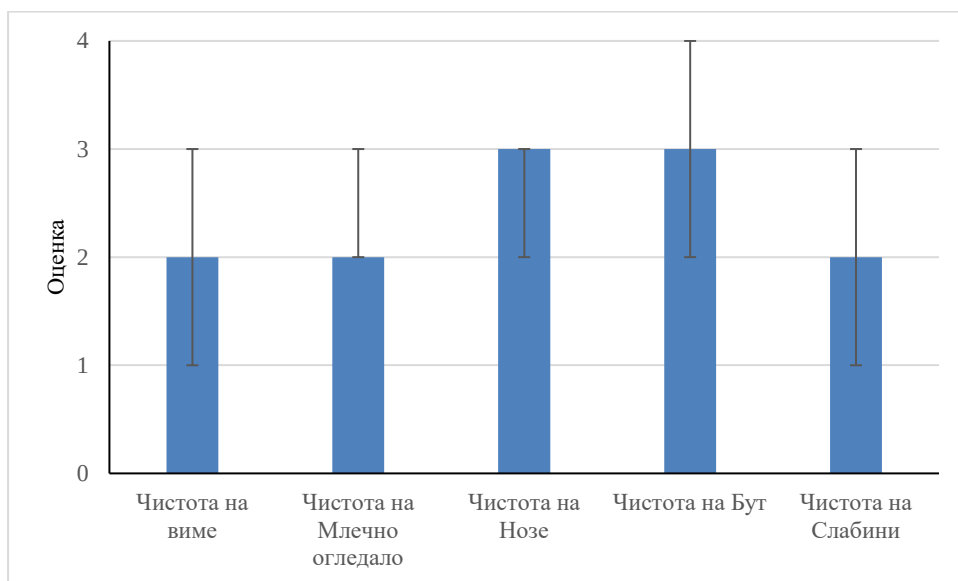
Графикон бр. 5В



Симболот * означува комбинација која е утврдена во помалку од 10 примероци.

На графиконите со број 5А, 5Б и 5В, прикажани се процентите на усогласеност на микробиолошкиот наод при едно (А), две (Б) и три (В) мострирања со финалната микробиолошка класификација на испитуваната четвртина. Секоја буква означува микробиолошка класификација од мострирањето, така што три букви означуваат три мострирања почнувајќи од лево кон десно.

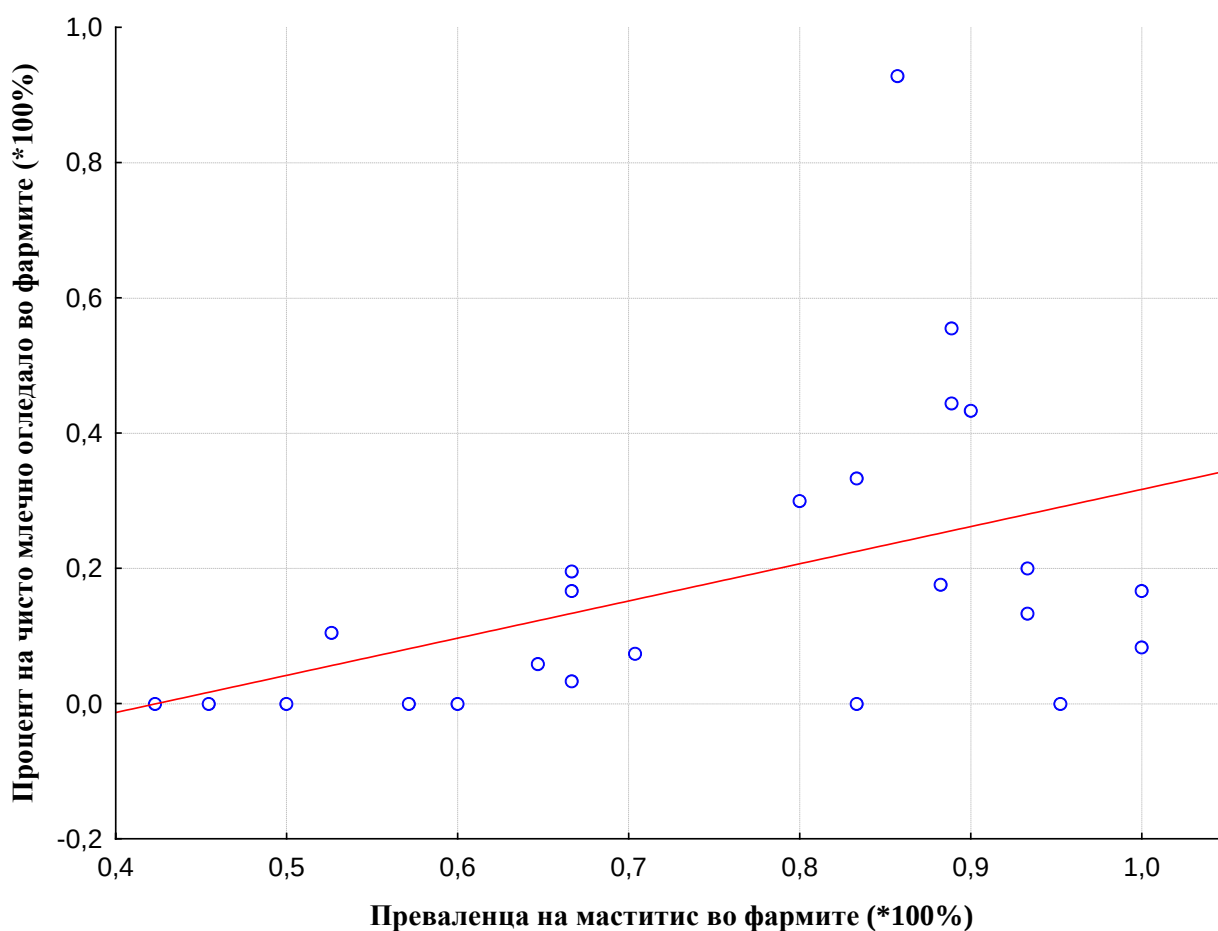
Графикон бр.6: Оценка на чистота на различни делови од телото кај испитуваните крави (n=384, медијана и 25-75 интерквартален опсег).



Графикон бр. 6: ја прикажува хигиенската оценка на поедини партии од телото на молзните крави, средната вредност на чистота на кравите во фармите се движеше во опсегот 1,00-3,24 за МЖ, 1,07-3,35 за млечното огледало; 2,00-3,40 за нозете; 1,86-4,00 за бутот и 1,00-3,59 за чистота на слабините. Просекот за чистота на МЖ беше 1.91; за чистотата на млечното огледало беше 2,36; за чистота на нозете беше 2,64; за чистота на бутот беше 3; и за чистота на слабините беше 2.

Во однос на застапеноста на СМ во испитуваните фарми се утврди дека таа се движи помеѓу 42-100% од молзните крави. Помеѓу застапеноста на СМ и средните вредности на чистотата на различни делови од телото во фармите не се утврди значајност при корелација на овие варијабли. Потоа се пресмета процентуалната застапеност на чисти делови на телото (односно процентот на крави со чистота на дел од телото оценет со еден) кој се движеше од 0-100% од кравите со чиста МЖ и слабина, до 93% од кравите со чисто млечно огледало, до 36% со чисти бутови и до 33% од кравите во фармите со чисти нозе. Во овој случај при спроведената Spearman Rank корелација се утврди значајна позитивна корелација помеѓу процентот на крави со чисто огледало на фармата наспроти застапеноста на СМ, Spearman $R = 0.50$, $p < 0.05$.
Графикон бр.6

Графикон бр.6



Графикон бр. 6: Корелација помеѓу застапеноста на СМ во испитуваните фарми и процентот на крави со чисто млечно огледало, $R = 0.50$, $p < 0.05$

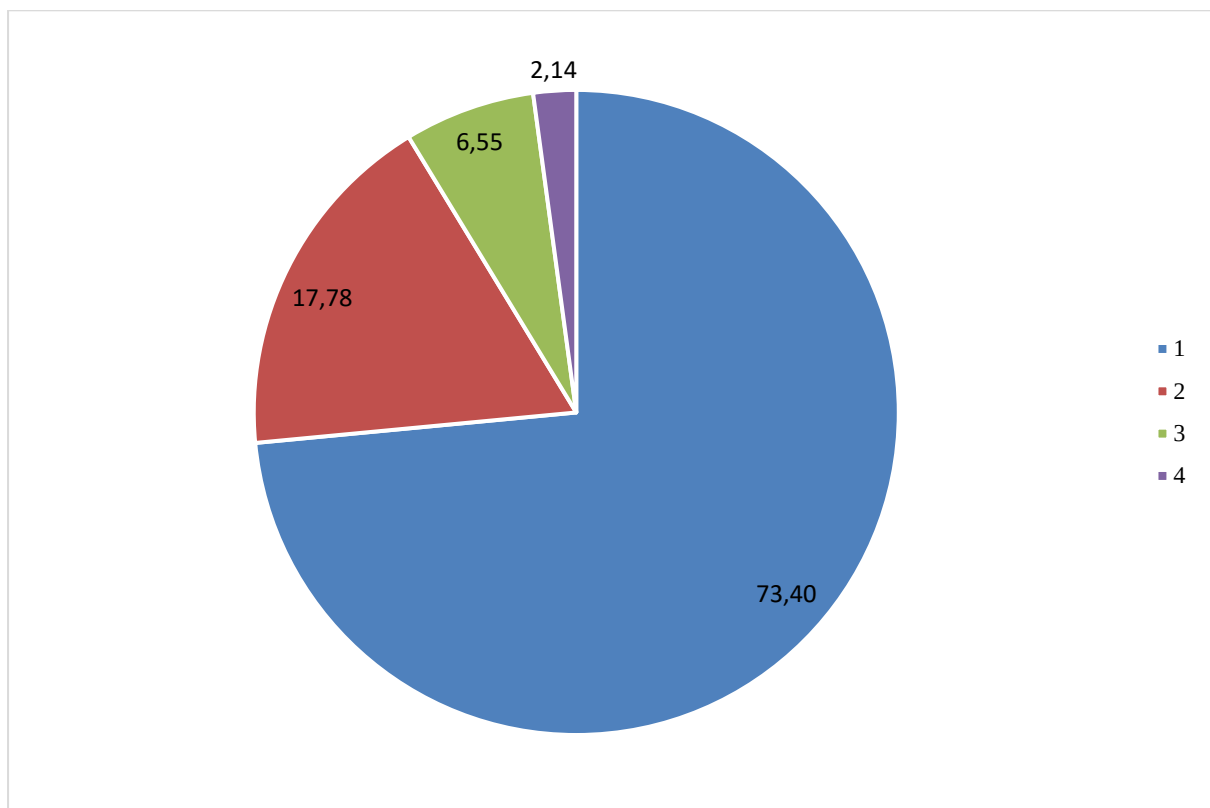
Бројот на соматски клетки во четвртините класифицирани според степенот на чистота на поедини партии од телото е прикажан во Табела бр. 6. При споредбите помеѓу групите на бројот на соматските клетки и чистотата на поедини партии, односно на МЖ ($F(3,380)=0.37$, $p=0.77$), млечното огледало ($F(3,380)=0.44$, $p=0.73$), нозете ($F(3,380)=1.92$, $p=0.13$), бутовите ($F(3,380)=1.73$, $p=0.16$) и слабините ($F(3,380)=1.36$, $p=0.26$), не се утврди статистички значајна разлика.

Табела бр. 6: Просечен број на соматски клетки (БСК*10³) ± SD кај кравите групирани според степенот на чистота на поедини партии на телото

Регија			Степен на чистота			
			1	2	3	4
Виме			569±709	599±1199	726±1317	581±678
Млечно огледало			616±695	653±1165	515±735	617±1135
Нозе	547±546	591±1074	508±666	856±1348		
Бут	945±722	532±701	461±563	670±1227		
Слабини	625±766	498±862	781±1555	554±624		

Иако студијата не можеше да утврди значајни разлики и асоцијативност помеѓу чистотата на поедини делови на телото со БСК на ниво на крава, но се забележуваат повисоки вредности на БСК кај кравите оценети со 4 во однос на чистотата на нозете.

Графикон бр.7: Процент на четвртини (n=1.494) според степенот на оштетување на боската (оштетување од 1 до 4).

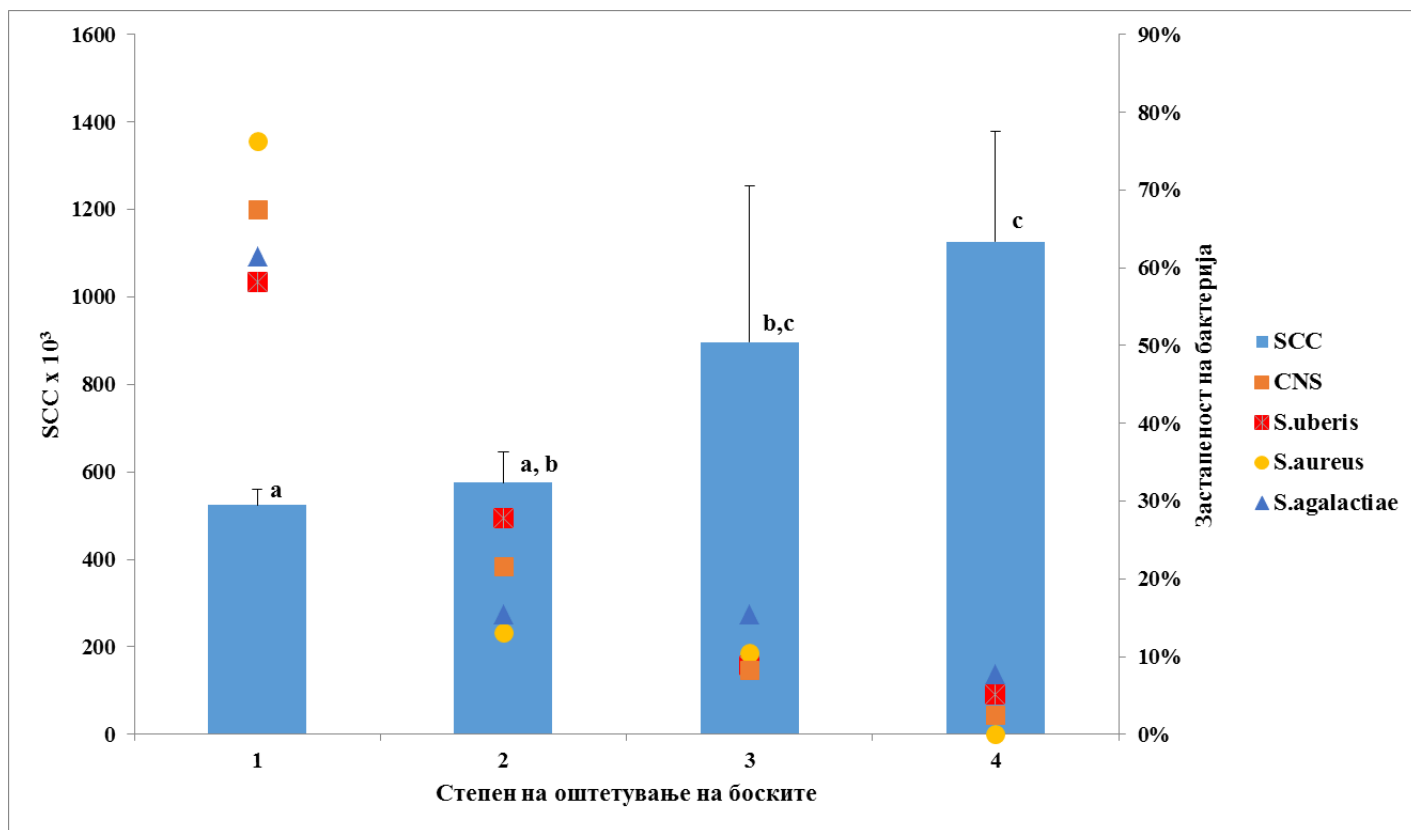


Степенот на оштетување на боските беше со медијана еден и интерквартлен (25-75) опсег од 1-2.

Според степенот на оштетување бројот на боски кој изнесуваше 1097 калсифицирани со 1 (без оштетување), 266 со степен на оштетување 2, 98 боски со трет степен и 32 боски со четврти степен на оштетување. Утврдена е значителна разлика во БСК помеѓу различно оштетените боски $H(3, N=1493) = 24.16, p < 0.001$. Притоа се утврди разлика на БСК помеѓу оштетувањата од прв и втор степен во однос на БСК во боските од четврт степен, како и помеѓу прв и трет степен, Графикон бр. 8.

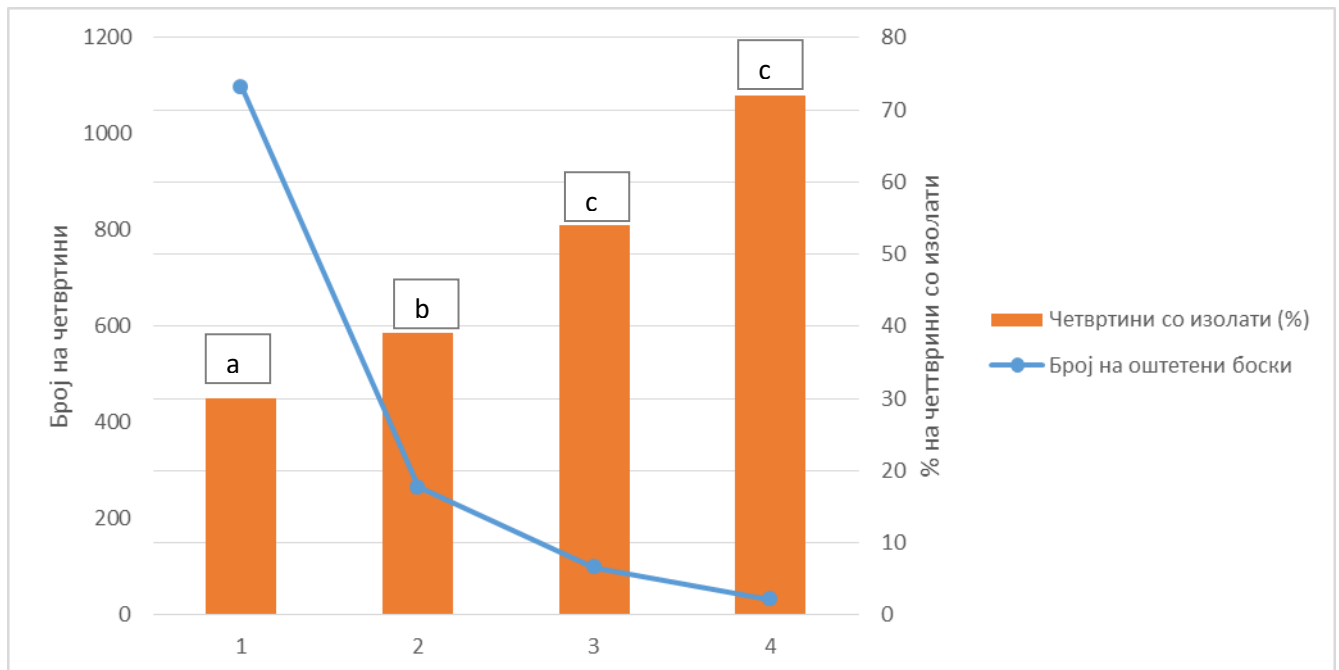
Се утврди дека не постои значајна разлика помеѓу застапеноста на сите видови бактерии и оштетувањата, $\chi^2(195, N=506) = 188.72, p=0.61$. Исто така, и при анализата на четирите најзастапени видови бактерии во студијата не се утврди статистички значајна разлика помеѓу овие бактерии кај различните оштетувања на боските $\chi^2(9, N=276) = 10.52, p=0.31$ Графикон бр.8.

Графикон бр. 8: БСК $\cdot 10^3$ (просечен број $\pm$ SE) во четвртините според степенот на нивно оштетување (1-4) десна ордината. Различните букви означуваат разлики во БСК помеѓу различните степени на оштетување, $p < 0.05$. Процентуална застапеност на најчестите изолирани бактерии во студијата кај различните оштетувања на боските, лева ордината.



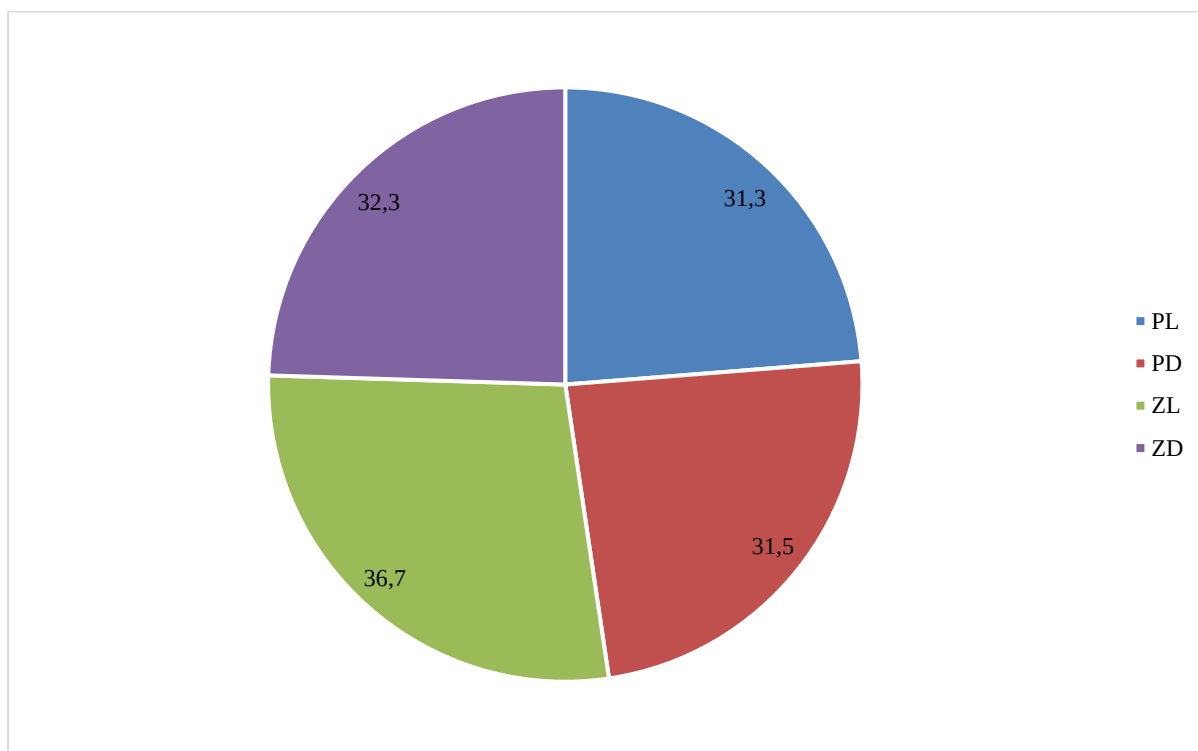
Бројот на четвртини според степенот на оштетување е прикажан во Графикон бр. 9. Во истиот график е прикажан и процентот на четвритини со бактериски изолати по однос на секоја категорија на оштетени боски.

Графикон бр. 9: Приказ на вкупниот број на оштетени боски по категорија (сина линија, 1-4) и процент на четвртини со изолиран причинител (столпчиња во проценти), различните букви означуваат статистички значајна разлика помеѓу групите.



Бројот на четвртини според степенот на оштетување е прикажан во графикон бр. 9. Во истиот график е прикажан и процентот на четвртини со бактерики изолати по однос на секоја категорија на оштетени боски.

Графикон бр.10: Процент на четвртини со микробиолошки изолати од вкупно испитаните PL= предна лева, PD = предна десна, ZL = задна лева и ZD = задна десна четвртина.



Во однос на утврдување одредена поврзаност помеѓу локацијата на четвртините и нивната класификација според СМ (ИМИ и БСК), не се утврди значителна разлика помеѓу бројот на СМ класифицирани четвртини и нивната локација, $\chi^2(9, N=1490)=5,65$, $p=0,77$.

Табела бр. 6: Детален приказ на бројот на четвртини според СМ класификација и нивната локација

Четвртина	Класификација по четвртина				Вкупно
	В	М	У	Н	
PD	216	37	92	29	374
PL	221	32	88	31	372
ZD	210	37	94	28	369
ZL	196	40	100	39	375
Вкупно:	843	146	374	127	1490

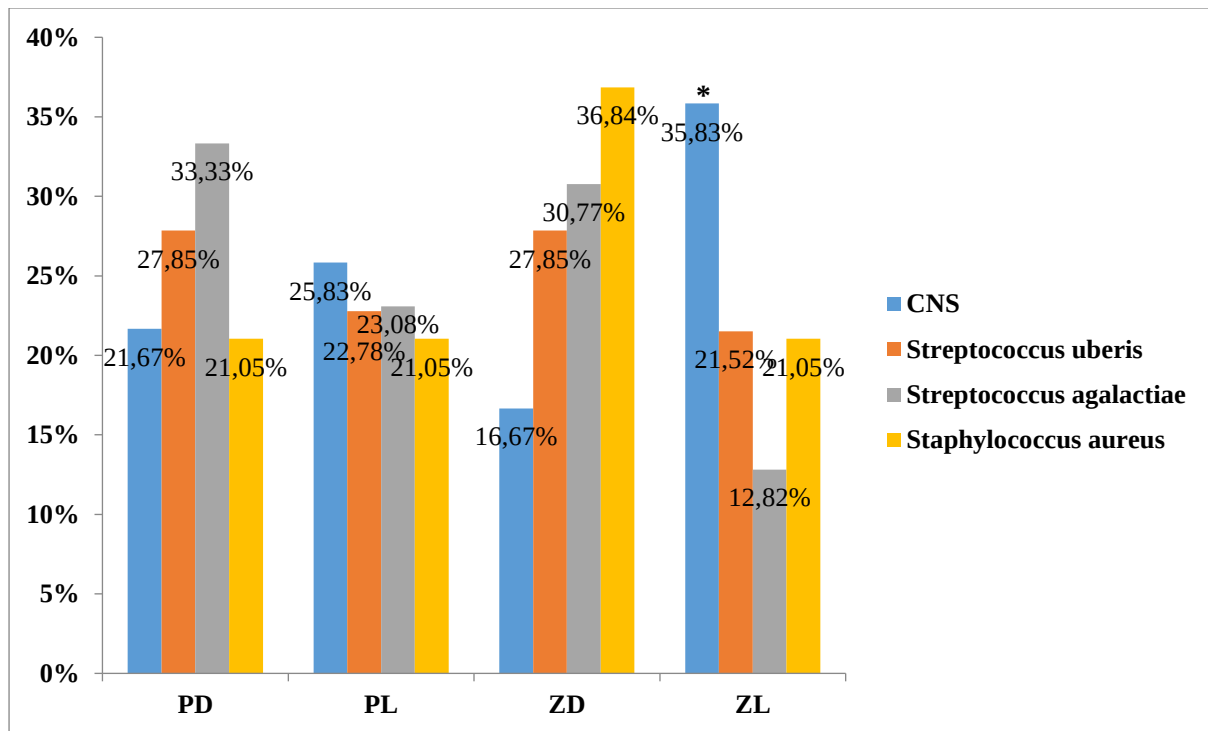
Во табела бр. 6, прикажан е бројот на четвртини според СМ статусот (**B** = БСК < 200 x 10³ и без наод на бактериолошки изолиран причинител); **N** = БСК < 200 x 10³ и бактериолошки изолиран причинител; **M** = БСК > 200 x 10³ и без наод на бактериолошки изолиран причинител; и **V** = БСК > 200 x 10³ и со наод на бактериолошки изолиран причинител и локацијата на четвртините (PL= предна лева, PD = предна десна, ZL = задна лева и ZD = задна десна четвртина).

Направена е споредба на бројот на изолати од бактериите за секоја четвртина со цел да се утврди доминација на бројот на изолати од поедина бактерија за одредена четвртина од МЖ. Притоа се утврди дека не постои статистички значајна разлика помеѓу бројот на изолати во секоја четвртина $H(3, N=264)=1,85, p=0,61$, Графикон бр. 10). Дополнително, и при отстранување на коинфекциите повторно не се утврди значителна разлика помеѓу четвртините $H(3, N=184)=0,48, p=0,92$.

Споредбата помеѓу застапеноста на најчестите бактерии изолирани во различните четвртини од МЖ, поточно нивната доминација во поедина четвртина, не се утврди значителна доминација на конкретна бактерија во одредена четвртина $\chi^2(9, N=276)=16,67, p=0,05$. Сепак со тестот на прилагодени резидуали се утврди значително повисок број на изолати на *CoNS* во ZL ($z=3.10$) во споредба со сите останати три бактерии и четвртини. Табела бр.7.

Графикон бр. 11: Процентуална застапеност на најчесто изолираните бактерии во четирите четвртини (PL= предна лева, PD = предна десна, ZL = задна лева и ZD = задна десна четвртина). *значително повисока звредност на прилагодени резидуали $z=3.10, p<0.05$ во однос на застапеноста на анализираните четири најчести бактерии.

Графикон бр. 11.



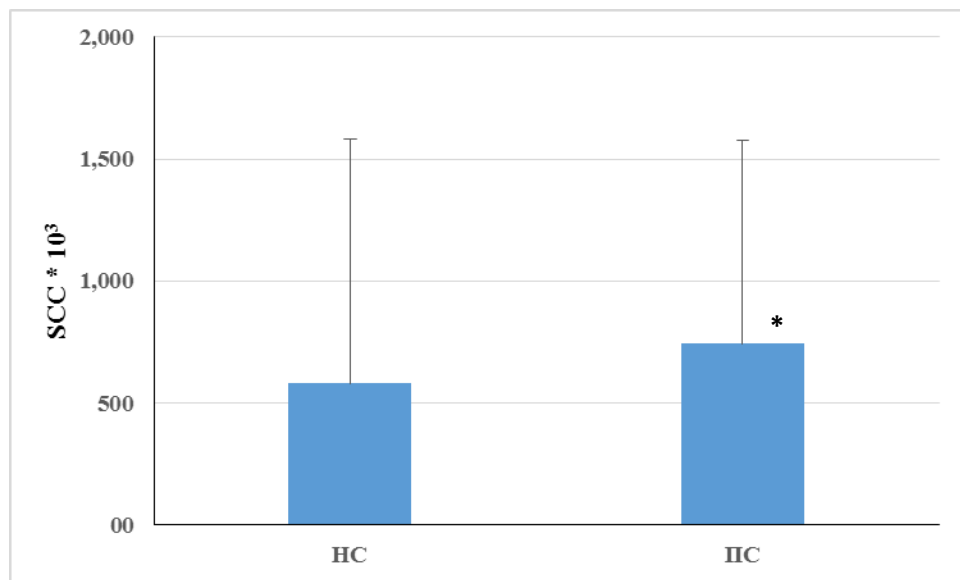
Табела бр. 7: Добиена вредност од Pearson Chi-square: 16,6745, df=9, p=,054078

Bakterii	PD	PL	ZD	ZL	Row
CNS	26	31	20	43	120
Streptococcus uberis	22	18	22	17	79
Staphylococcus aureus	8	8	14	8	38
Streptococcus agalactiae	13	9	12	5	39
All Grps	69	66	68	73	276

Вредностите на прилагодени резидуали (adjusted residuals) прикажаа значително повисок број на изолати на *CoNS* во ZL ($z=3.10$) во споредба со сите останати три бактерии и четвртини.

Се утврди дека кравите чија МЖ е под скочниот зглоб имаат значително повисок БСК во млекото ($Mdn=456 \cdot 10^3$), наспроти оние со МЖ над скочниот зглоб ($Mdn=225 \cdot 10^3$), $U=7014$, $p=0.012$. Графикон бр. 12

Графикон бр.12.



Графикон бр. 12, Просечен БСК $\pm$ SD ($\cdot 10^3$) на кравите со МЖ под скочниот зглоб (ПС) и кравите со МЖ над скочниот зглоб (НС).* = $p < 0.05$.

6. ДИСКУСИЈА

Во последните децении, фокусот на млечната индустрија е насочен кон добивање на високо квалитетно млеко, зголемување на хигиената на фармите и пронаоѓање на најразлични протоколи со цел да се намали употребата на антибиотици во процесот на производство на млеко. Затоа и целта на оваа докторска дисертација беше да се утврди моменталната состојба на застапеноста на СМ во фармите на различна територија на Р. С. Македонија, да се утврди методолошката постапка која е оптимална за дијагностицирање на СМ, да се одреди нивото на хигиената на фармите и други ризик фактори кои евентуално имаат поврзаност со СМ, како и антимицробната отпорност на дел од причинители на оваа болест.

Во нашето истражување застапеноста на СМ на ниво на крава беше 74%, додека застапеноста на ниво на четвртина беше 43%. Ваквите добиени резултати укажуваат на премногу висока застапеност на СМ во малите краварски фарми во Р. С. Македонија, каде речиси секоја четврта крава е здрава. Добиените резултатите во нашето истражување за застапеноста на СМ ќе бидат споредени со неколку други слични истражувања од сосема два различни системи на управување на фарми со молзни крави.

Во првиот систем, а тоа се земјите во развој, каде одгледувањето на млечни говеда првенствено е за основна егзистенција. Застапеноста на СМ на ниво на крава и четвртина била пријавена во Косово со 26% и 12%, во Шри Ланка 43% и 19%, во Танзанија 76% и 46% и во провинцијата Асуит Говернорате во Египет, резултатите биле 19% на ниво на крава и 5.7% на ниво на четвртина (28, 29, 27, 22). Освен во Танзанија каде резултатите во однос на застапеноста на СМ биле речиси слични со нашите, во останатите земји застапеноста била далеку пониска. Во ниту една од споредените студии не се користеле никакви превентивни хигиенски практики при постапката на молзење.

За ваквата пониска застапеност на СМ кај нив во однос на нашето истражување, причината ја толкуваме од два различни аспекта. Првичната причина е во тоа што во сите овие студии, молзењето било на рака, со што на тој начин се контролира дали сеуште има заостанато млеко во МЖ. Исто така, се работи за крави со ниска

продукција на млеко (29), каде дополнително после молзењето ги пуштаат и телињата кои максимално го извлекуваат заостанатото млеко во МЖ (27). Sanotharan N. et al. (2016) пријавиле застапеноста на СМ од 32.5 % и 89.7 % кај кравите кои после молзењето биле цицани и не цицани од телињата (29). Другата причина е во постапката на земање на мострите и кои вредности се користеле за една четвртина т.е. крава да биде прогласена за позитивна на СМ. Освен во истражувањето во Танзанија (27), во останатите студии прелиминарно сите четвртини биле испитани со калифорнија маститис тест (КМТ), каде дополнително само од КМТ позитивните четвртини било земено млеко за бактериолошка изолација. Калифорнија маститис тестот дефинитивно е практичен, лесен за употреба и ефтин дијагностички тест, но како метода е премногу субјективна (22, 128). Ова укажува дека оценувањето со КМТ, добиениот резултат како слабо позитивен или негативен пред се зависи од самото искуство на оценувачот. На овој начин лесно може да биде погрешно протолкувана т.е. класифицирана четвртината како позитивна или негативна, а индиректно и самата крава. Според Dohoo I. T. et al. (1982) од самите почетоци на примената на КМТ, укажува дека пресекот на КМТ е од 150.000 до 400.000 кл/мл, а слабо позитивниот примерок се карактеризира од 300.000 до 1.000.000 кл/мл (18). Исто така, еднократното земање на млеко за КМТ може да даде погрешно толкување, бидејќи според Sharma N. et al. (2011) флукуацијата на БСК во самата четвртина помеѓу две молзење од иста крава може да варира од 30-35% (23). Затоа во нашето истражување за позитивни четвртини врз основа на БСК беа прогласени само четвртините кој имаат >200.000 кл/мл на два од три земени примероци на млеко за БСК. Дополнително остануваат бактериолошки не испитани четвртините кој се КМТ негативни, што не значи дека се навистина негативни. Во нашето истражување тој процент на бактериолошки позитивни четвртини, а со БСК < 200.000 кл/мл беше 8.5 %. Тоа не е мал процент на четвртини кои би биле пропуштени т.е. идентификувани како лажно негативни кога во истражувањето за бактериолошка анализа се земаат само КМТ позитивните четвртини. Особено во оваа група би биле пред се латентно инфицираните четвртини и четвртините инфицирани од слабите маститис патогени М/О како: *CoNS* и *Corynebacterium bovis*, но не се исклучува можноста дека и при низок БСК во четвртините може да бидат изолирани и контагиозни причинители. Овој податок е во согласност со истражувањата и на други автори кои го испитувале просекот на БСК во инфицираните четвртини од веќе наведените причинители. Tomazi T. et al. (2015) во своето истражување утврдиле дека просекот на БСК во четвртините инфицирани со

CoNS бил 306.106 кл/мл (58), додека Djabri B. et al. (2002) прикажале дека просекот на инфицираните четвртини со *Corynebacterium bovis* и CoNS бил 138.000кл/мл и 105.000кл/мл (80). Исто така Pitkälä A. et al. (2004) пријавиле дека во половина од *S. aureus* позитивните четвртини БСК бил <300.000кл/мл (129). Sampimon O. et al. (2009) навеле дека и во кравите со низок БСК изолирале *S. aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* и *Streptococcus uberis* (130). Истото, беше потврдено и во нашата студија, односно изолиравме *S. aureus* и *S. agalactiae* од четвртини со 44.000кл/мл, додека *S. uberis* од четвртина со 15.000 кл/мл. Со ова се согласни и Bhutto A.L et al. (2012) кои наведуваат дека КМТ има поголема веројатност да ги детектира четвртините инфицирани со големи (*major анг.*) отколку со слабите (*minor анг.*) маститис патогени М/О, каде додаваат дека КМТ има висока сензитивност, а ниска специфичност (128).

Во вториот систем се фармите за производство на млеко во високо развиените земји кои имаат современ начин на одгледување на млечните говеда, се применуваат соодветни хигиенски практики на МЖ. Применуваат редовни месечни контроли како и субвенции или казни во однос на квалитетот на самото млеко, затворени стада (*не смеат да се купуваат и продаваат*) и се редовно под контрола на националните програми. Исто така во однос на застапеноста и идентификација на најчестиот причинител се воведуваат и применуваат соодветни превентивни мерки на долг рок.

Застапеноста на СМ во Финска е 31% на ниво на крава, во Холандија 22%, во Германија резултатите се пријавени само на ниво на четвртина и тој процент е 26%, во Рагуза, Италија застапеноста на ниво на крава била 49.4%, додека во Полска тој процент по крава и четвртина бил 37% и 16% (129, 130, 114, 131, 132). Резултатите од цитираните студии споредени со нашите резултати укажуваат дека за 2/3 имаат помала застапеност на СМ, како на ниво на четвртина така и на ниво на крава. Секако, за ваквата ниска застапеност на СМ во овие земји причината е во задолжителната примена на хигиенските практики при самата постапка на молзење. Во истражувањето во Финска (129) застапеноста по крава од 31% е приказ на крави со барем една четвртина со БСК >200.000кл/мл, додека бактериолошка изолација е утврдена кај 33.5% од сите четвртини. Слично било и истражувањето во Холандија (130), каде прелиминарно од севкупните крави, 22% биле крави кои имале >250.000 кл/мл и биле породени два или повеќе пати и крави со БСК >150.000кл/мл кои биле само еднаш породени. Каде од нив се добила бактериолошка изолација во 38% од испитаните четвртини на тие 22% крави со висок БСК. Тоа е и разликата помеѓу овие две

истражувања, каде во првото истражување (во Финска) бактериолошко култивирање е направено на сите четвртини, додека во истражувањето во Холандија бактериолошко култивирање е направена само на кравите со висок БСК. И двете истражувања за прогласување на четвртината за бактериолошки позитивна, користеле ист лимит т.е да има >500 cfu/мл. Дополнително, не се направени мострирања со цел да се види повторливоста на истиот изолиран маститис патоген причинител во дадената четвртина, што најверојатно може да доведе кон висок број на лажно позитивни четвртини. Во споредба со резултатите добиени од Германија (114) каде застапеноста по четвртина била 22% и Рагуза во Сицилија (131) застапеноста по крава била 49.4%, и во двете истражувања не е користен БСК како индикатор за СМ, туку добиените резултати се темелат само на бактериолошката изолација од млеко по четвртина. Во истражувањето во Германија (114) пробите, се земени по случаен избор од фармите, и ги користеле препораките од НМС каде за позитивни ги прогласуваат само четвртини со cfu/ml > 100 за *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae*, додека за слабите маститис патогени (*minor* англ.) се користел cfu/ml >1000 . Во спротивно, за истражувањето во Рагуза (131) користеле друг лимит, каде за главните патогени М/О бил истиот критериум, додека за слабите маститис патогени М/О (*minor* англ.) користеле cfu/ml >300 што го прави тестот уште по сензитивен. Дополнително, високата застапеност на СМ кај нив се поврзува поради фактот на користење на сумирани проби од истите стада во период од 6 год, и се доставени примероци од крави со висок БСК, атрофија на МЖ и благи клинички симптоми, каде што некои крави се повторувале низ целиот период на истражувањето. Во истражувањето во Полска (132), добиена е застапеност од 37 и 16% на ниво на крава и четврт. Овој процент е добиен со пресметка на сите четвртини кои имаат БСК >400.000 кл/мл, додека процентот на бактериолошка изолација од овие четвртини бил 89%. Карактеристично за ова истражување било што испитувањето е направено пред самото пресушување на кравите, каде неминовно е последователно да имаат и повисок БСК во период каде кравите се речиси најприемчиви за инфекција на МЖ. Добиените резултати во ова истражување методолошки се најслични со нашето, но сепак застапеноста на СМ е далеку пониска.

Во направената споредба со истражувањата од другите земји, дефинитивно самите практики и начини на управување во фармите имаат најголем удел во застапеноста на СМ, но сепак во однос на прикажаните резултати може да влијае и

протоколот т.е. методологијата која се користела при истражувањето т.е. кои вредности се земани при прогласувањето на четвртината како позитивна или негативна на СМ. Со ова се согласни и Pitkälä A. et al. (2001) кои наведуваат дека секогаш одредени крави ќе бидат дефинирани како лажно позитивни или лажно негативни (129).

Со веќе компарирани истражувања, најслични резултати добивме со истражувањето во Танзанија (27). Тие прикажале застапеност на СМ одредена само со КМТ 76% по крава и 46% по четвртина, додека кај нас тој процент беше 74% по крава и 34.8% по четвртина. Но, сепак во однос на процентот на бактериолошка изолација по четвртини тие добиле 24.3%, додека кај нас тој процент беше 33.4%. Ваквата разлика на повисок процент на КМТ позитивни четвртини, а помал процент на бактериолошки позитивни четвртини во однос на нашето истражување каде имаме помал процент на позитивни четвртини према БСК, а повисок процент на бактериолошки позитивни четвртини, најверојатно се должи на нашето трикратно земање на мостри во однос еднократното земање на мостри. Со ова се согласни и Persson Y. et al. (2011) кои укажуваат дека еднократното земање на примероци има ниска сензитивност на наодот на инфицираните четвртини (21). Dzabri B. et al. (2002) наведуваат дека сензитивноста за бактериолошка изолација на *S. aureus* при еднократно земање на мостри е 60% додека со трикратно земање достигнува до 91% (80). NMC (2012) укажуваат дека со примена на трикратното земање на примерок млеко се подига сензитивноста, која е способна да ги открие ИМИ, додека со подигање на специфичноста ќе се добие правилна идентификација на не инфицираните четвртини (118). Дополнително со трикратното земање примероци на млеко, се минимизира т.е. воопшто немавме контаминирани примероци. Споредено со истражувањата каде применувале само еднократно земање на млеко процентот на контаминирани примероци бил: 13% Рона-Алпи Франција, 3.3% Танзанија и 3% во Швајцарија (30, 27, 133). Дефинитивно, златен стандард е изолација на соодветниот причинител, трикратното земање на млеко драстично го зголемува процентот на бактериолошка изолација по четвртина, но не секогаш успеваме да го изолираме причинителот. Ова укажува дека ако се користи само бактериолошки наод таквите четвртини или крави може да бидат прогласени како лажно негативни. Во нашето истражување од вкупно испитаните четвртини 35% беа со БСК >200.000 кл/мл, од кои 28% беа без бактериолошки изолат. Resul K. et al. (2016) во Турција, детектирале застапеност на СМ на ниво на четвртина со КМТ 16.14%, додека

од нив бактериолошката изолација утврдиле само во 60.8% (78). Во истражувањето во Шведска, 1/5 од КМТ позитивните четвртини биле бактериолошки негативни (21), додека во Уругвај, Gianneechini R. et al. (2002) во своето истражување на застапеност на КМ и СМ, бактериолошка изолација добиле во 32.5% од пробите кои потекнувале од КМ, додека во четвртините со БСК > 300.000кл/мл бактериолошка изолација добиле само во 45% од севкупните примероци на млеко (117).

Неможноста за изолирање на причинителот во млекото е разновидна и тоа: **а).** спонтан лек во млекото; **б).** присуство на многу малку одржливи бактерии; **в).** инхибиција на бактериите со антибиотици; **г).** бактериите продолжуваат да бидат убивани после земањето на мострата, а пред да се култивираат; **д).** замрзнувањето на млечните примероци има влијание врз способноста за изолирање на специфични бактерии; **ѓ).** поретки причинители на маститис бараат други процедури за нивна изолација; и **е).** инфекции со кратко траење (21, 22, 117, 131). Ferguson J. D. et al. (2007) наведуваат дека 25-40% од анализираните мострите добиени од КМ немале бактериолошки изолат, и додаваат дека cfu/мл треба да е најмалку 100 за да има голема веројатност за изолација на причинителот. Но, и во навистина инфицираните четвртини cfu/мл може да е <100 или ако инфекцијата е слаба и бактериите се прелеваат најизменично или пак се заплени од полиморфонуклеарните леукоцити па изолацијата е отежната (131).

Освен неможноста во изолирање на причинителот која не зависи само од нас постојат и други дополнителни можни фактори кои можат да влијаат на овој процес, а тие можат да бидат:

- Forsback L. et al. (2009) наведуваат дека инфекција со *S. aureus* е во постојан циклус со БСК, кога има висок БСК има ниско прелевање на бактериите и обратно (87).

- Околинските причинители на маститис како *E. coli* како и дел од CoNS причинителите се инфекции кои може да траат околу 30 дена и може да предизвикаат имунолошки одговор кој може да трае подолг период дури и кога ќе дојде до само излекување т.е. се елиминира причинителот (77).

- Некои хронично заразени четвртини спонтано ги елиминираат бактериите од млекото кои така даваат лажно негативни примероци (80). Dzabri B. et al (2002) во

нивната анализа наведуваат дека во отсуство на дијагностицирана бактериска инфекција аритметичката средина на БСК во млекото варира од 27.000 до 600.000 кл/мл што е речиси трикратно повеќе од лимитот кој се користи за прогласување на СМ врз основа само на БСК (80).

- Можеби и некои четвртини т.е крави се навистина негативни, иако имаат зголемен БСК, бидејќи Sharma N. et al. (2011) во своето истражување наведуваат дека БСК во две последователни молзење варира и до 30%, а додека дневните варијации достигнувале и до 40% (23).

- Дополнително на ниту една фарма каде што беше спроведено нашето истражување не се води млечен картон т.е. не се знае кога последен пат имала и дали имала КМ, не се прават месечни контроли на БСК на ниво на крава. Фармите т.е. кравите не се внесени во систем за следење на нивниот здравствен статус на МЖ како и никогаш не се шкартираат кравите со хронични инфекции на МЖ.

Во нашето истражување од бактериолошки позитивните четвртини највисок процент на изолирани причинители имавме од четвртини со БСК <200.000 кл/мл или 22%. Деветнаесет проценти од причинителите беа изолирани од четвртини со БСК од 200.000 до 400.000, и кај 10% од четвртините со БСК од 400.000 до 600.000 кл/мл. Спротивно од нас Edward M. et al. (2006) наведуваат дека колку оценката на КМТ е повисока, толку веројатноста да се изолира причинителот е поголема (134). Иако, скапа како постапка сепак применивме трикратно земање на примероци на ниво на четвртина бидејќи само така може да добиеме релевантни податоци. Земањето на млеко за БСК на ниво на крава за да биде исправно треба да се зема од канта од кога ќе се измолзе целокупното млеко од кравата, додека на ниво на четвртина може и од неколкуте млазови после првите 3-5 млазови кои треба да се исфрлени на страна (80). Forsback L. et al. (2009) во своето истражување утврдиле дека кога БСК е <100.000 кл/мл во збирното млеко, повеќе од 10% од индивидуалните четвртини дале КМТ >3, а од нив 50% биле и бактериолошки позитивни (87). Оваа состојба, се објаснува како последица на разрежувањето каде доколку другите четвртини се здрави и имаат низок БСК, инфицираната четвртина нема да се детектира.

Дефинитивно освен познавањето на застапеност на СМ во нашите фарми неминовно е да се знае и кои се најчестите негови причинители, бидејќи низ годините се менуваат и најчестите маститис патогените М/И. Тоа е дополнително важно бидејќи

контролните програми на ниво на држава или фарма во намалување на застапеноста на СМ се темелат према соодветниот причинител, како и со познавање на неговите карактерни својства.

Во нашето истражување *CoNS* беа најчесто изолирани причинители на СМ со 23% од севкупните бактериолошки изолати. Во повеќето истражувања се наведени како униформна група каде и како такви се презентирани. Освен во нашето истражување, доминантност во изолацијата на *CoNS* пријавиле и Pitkälä A. et al. (2001) со 50%, Toronen S. et al. (2017) во Финска 45%, Persson Y. et al. (2011) во Шведска 27%, додека пониска застапеност пријавиле Resul K. et al. (2016) во Турција и Gianneechini R. et al. (2002) во Уругвај со по 20% и 7%. (129, 135, 21, 78, 117). Дополнително, тешко е да се споредат резултатите од студите во однос на застапеноста на *CoNS* бидејќи различни студии користат различни критериуми при дијагностицирање на примерокот т.е. при утврдување дали тој е бактериолошки позитивен или не. За разлика од лимитот кој е унифициран при прогласување на четвртината дека е инфицирана со *S. aureus* и *s. aglactiae* (114, 118, 130), за потврдувањето на четвртините за инфицираност со *CoNS*, различни студии користеле различен лимит и тоа: Persson Y. et al. (2011) >300 cfu/1ml, Pitkälä A. et al. (2001) >500cfu/ 1ml, Tenhagen B. A. et al. (2006) >1.000cfu/1ml или таргетирана ДНК на целни причинители со PCR анализа Taponen S. et al. (2017)(21, 129, 114, 135).

Во нашето истражување утврдивме 15 различни видови на *CoNS*, од кои најзастапени беа: *Staph. haemolyticus*, *Staph. chromogenes*, *Staph. simulans* и *Staph. epidermidis*. Cervinkova D. et al. (2013) идентификувале 19 видови на *CoNS* од кои најдоминантни биле: *Staph. scuri*, *Staph. xylosus*, *Staph. arlettae* и *Staph. warneri*. (136). Ndahetuye J. B et al. (2019) во Руанда утврдиле 12 видови од кои најдоминантни биле: *Staph. epidermidis*, *Staph. scuri*, *Staph. chromogenes*, додека *Staph. xylosus* и *Staph. haemoliticus* биле со ист процент на застапеност (137). Додека во истражувањето на Frey Y. et al. (2013) во Швајцарија најдоминантни причинители биле: *Staph. xylosus*, *Staph. chromogenes*, *Staph. scuri* и *Staph. haemoliticus* (138). Споредувајќи ги нашите и резултатите од цитираните студии се забележува голема варијабилност во застапеноста на различните *CoNS* причинители. Причината за таа варијабилност е мултифакторијална, вклучувајќи го : системот на сместување, менаџментот на стадото, големината на стадото и хигиенските практики при актот на молзење. Со оглед на тоа кои причинители во нашето истражување се најдоминантни може да се утврди нивниот

извор т.е. грешките во менаџирањето, како и кои превентивни мерки треба да се применат. Изворот на *Staph. haemolyticus* пред се е од околината, простирката и МЖ (114, 137), *Staph. epidermidis* од кожата на молзачите каде некогаш појавува и контагиозно својства (137), додека *Staph. chromogenes* и *Staph. simulans*, првиот е неминовен дел од флората на МЖ и каналот на боската, додека вториот е изолиран и од КЛ и од СМ (114). Имајќи ја во предвид доминацијата на *CoNS* како група и нејзините видови во македонските краварски фарми превентивните мерки би требало да одат во насока на: чиста простирка, потопување на боските пред молзење, пресушување со антибиотици, забрана на меѓусебно цицање како и одржување на поголема хигиена во групниот бокс кај јуниците (52, 54, 57).

Strep. uberis беше вториот најчесто изолиран причинител на СМ (15.7%). Пониска застапеност од нас пријавиле Tenhagen et al. (2006) во Германија (3.7%), Taponen S. et al. (2016) во Финска (8%), Sylejmani D. et al. (2015) во Косово (6.2%) и Persson Y. et al. (2011) во Шведска (14%) додека повисока застапеност пријавиле Resul K. et al. (2016) во Турција (20%) (114, 135, 28, 21, 78). Во нашето истражување горе наведениот причинител беше идентификуван во 62.5% од фармите (n=15), каде застапеноста во фармите се движеше од 2-83%. Високата застапеност на овој агенс, како и широката дистрибуција на застапеноста во и помеѓу фармите може да се должи на следниве моменти:

- Во сите наши испитани фарми се користеше простирка која е од органско потекло (*слама или тилевина*), која претставува идеално место за развој на околинскиот *strep. uberis* (46, 48).

- Отсуството на хигиенски практики во македонските фарми и не применување на антибиотското пресушување, кое има силно влијание во застапеноста на овој причинител. Имајќи во предвид дека најголемиот број на инфекции предизвикани од него настануваат за време на пресушувањето на кравите (46, 48).

- *Strep. uberis* е предизвикувач и на хронични перзистентни ИМИ, а исто така инфицираните четвртини се подложни кон ре-инфекции од истиот причинител (49, 139). Ова укажува на долготрајна перзистенција на причинителот и повторна негова изолација и во следните лактации.

- Карактеристичната застапеност која може да е повисока и од застапеноста на контагиозните причинители (*S. agalactiae* и *S. aureus*) може да се должи на пренесување на инфекција од крава на крава и од четвртина на четвртина. Така на пример, на една од фармите со 12 крави овој причинител беше утврден кај 8 крави (83.3%) со вкупно инфицирани 29 четвртини. Од овие причини и Douglas V. L (1999) и Zadoks R. N. et al. (2001) констатираат дека *strep. uberis* може да се однесува и како околински и како контагиозен патоген, во зависност од сојот и условите (47, 49).

Оттука, во намалување на неговата застапеност на македонските фарми се препорачува: дезинфекција на боските пред молзење, замена на органските простирки со простирки од неорганско потекло или пак да се одржува pH >9.5 во органските простирки и задолжително антибиотско пресушување.

Со ист процент на застапеност (8.5%) беа *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae*. Пониска застапеност на *S. aureus* од вкупните изолирани причинители пријавиле Resul K. et al. (2016) во Турција (4%), додека повисока застапеност пријавиле: Cervinkova D. et al (2013) во Република Чешка (9%), Tenhagan B. A. et al. (2006) во Германија (22%), Taponen S. et al. (2017) Финска (26%). (78, 136, 114, 135). Исто така, застапеноста на *Strep. agalactiae* беше варијабилна во однос на нашето истражување. Така, Tenhagan B. A. et al. (2006) во Германија репортираат 2.7%, A. Pitkälä et al. (2001) во Финска 0.1%, Cervinkova D. et al (2013) во Полска 0.7%, Persson Y. et al. (2011) во Шведска 0.2%, додека со повисока застапеност од нашата пријавиле Sylejmani D. et al. (2015) 14% во Косово. (114, 129, 136, 21, 28).

Историски гледано, овие патогени причинители се групирани како контагиозни (*major* англ.) заради нивната слична епидемиологија. Но, сепак постојат значајни разлики во нивната патобиологија што резултира со големи варијации во застапеноста во стадата и во најразвиените млечни индустрии. Пред се, и во нашето истражување како и во дел од цитираните истражувања видливо е нивно меѓусебно исклучување во фармите. Дополнително констатиравме повисока контагиозност по крава и четвртина на ниво на фарма со *Strep. agalactiae* во однос на *S. aureus*. *Strep. agalactiae* беше изолиран во помал број на фарми, односно 17% (n=4). Но, процентот на инфицирани крави беше поголем и се движеше од 10-71%. Velez J. R. (2016) ги сумирал податоците од истражувањата направени за застапеноста на *Strep. agalactiae* на ниво на стадо каде тој процент бил 42% во Колумбија (2011), 4% во Канада (2010) и 1.6 % Принц Едвард (70).

Staphylococcus aureus беше застапен во 58% од фармите (n=14), каде процентот на заразените крави во овие фарми се движи од 3.3-66%. Benic M. et al. (2011) пријавиле застапеност на *S. aureus* на ниво на стадо од 2-50% па и повеќе, во зависност од хигиенските практики (35).

Повеќето погоре цитирани истражувања укажуваат на многу ниска застапеност на *Strep. agalactiae* во споредба со нашето, со исклучок на истражувањето спроведено во Косово. Ова истражување е единствено од споменатите каде се уште се применува рачно молзење на фармите, што се наведува како причина за високиот процент на застапеност не само на *Strep. agalactiae*, туку и на *Staph. aureus* (29%) (28). Ниската застапеност на *Strep. agalactiae* во современите фарми т.е. развиените земји се должи најмногу поради примената на Планот од пет точки (48). Планот од пет точки Neave F. K. et al. (1969) првично е дизајниран да ја намали застапеноста и да го спречи ширењето на *Strep. agalactiae* во фармата (140). Планот понатаму продолжува да се користи како неминовна алатка на фармите во борбата со контагиозните причинители на СМ. Овој план се состои од:

1. Потопување на боските после молзење
2. Пресушување на кравите со примена на антибиотик во секоја четвртина
3. Редовно и навремено третирање на КМ
4. Шкартирање на хронично инфицираните крави
5. Редовно одржување на системот за молзење.

Во нашето истражување само на две од испитаните фарми се применува периодична примена на потопување на боските после молзење и евентуално примена на антибиотска терапија при засушување на кравите т.е. само ако имало видлива промена на МЖ, млекото или ако одредена четвртина имала КМ во текот на лактацијата. Отсуството на ваквите практики може да е причина за високата застапеност на контагиозните причинители особено на *Strep. agalactiae*. Спротивно, ниската застапеност на *S. aureus* при отсуството на практиките како што е планот со петте точки, може да се должи и поради високиот БСК, кои преку неутрофилниот лизозомски ензим (АОАН–aceloxiacilhidrolaza) ја заштитуваат четвртината од инфекција со овој контагиозен маститис патоген (141). Дополнително, високата застапеност на инфицираност со околинските маститис патогени М/О го инхибира растот и развојот на *S. aureus*.

И покрај примената на планот во пет точки, неговиот успех во однос на двата контагиозни причинители е различен токму поради нивните карактеристики. Првично само со тријажни бактериолошки испитувања на млекото од лактофризерот може да се установи присуството на *Strep. agalactiae* што понатаму директно е поврзано со инфицираната МЖ, што тоа не е случај при изолацијата на *S. aureus* (69, 73). Кај *S. aureus* различните патогени својства на соевите придонесуваат да има разлика во: количеството на инокулум потребен за да предизвика инфекција, контагиозноста во самото стадо, траењето на инкубациониот период и ефектот од антибиотската терапија. Така на пример, во нашето истражување на четири фарми утврдивме инфицираност со *S. aureus* само на една крава и на една четвртина. Тоа што е помалку контагиозен, што е спротивно од *Strep. agalactiae*, не го прави нималку послабо патоген. Според претходните наоди, Rainard P. et al. (2017) заклучуваат дека постои широк спектар на соеви на *S. aureus* каде дел од нив може да се однесуваат и како околиски маститис патогени, како и дека повеќето стада имаат доминантен сој на фармата (34).

Особено е изразена разликата во нивното третирање и ерадикација од стадото. *Strep. agalactiae* и покрај својата висока контагиозност сеуште е осетлив на пеницилинските препарати и неговиот процент на излекување се движи од 84-100% (70). Спротивно од него, процентот на успешност при терапирањето кај *S. aureus* се движи од 4-92% (33, 45). Ваквата состојба т.е. антибиотка резистентност кај *S. aureus* се должи поради неговите својства и тоа: **а).** продирање во ткивото на МЖ и формирање апсцеси и фиброза околу себе со што во променетото ткиво тешко се постигнува минимална инхибиторна концентрација; **б).** преживува во неутрофилите; **в).** интрацелуларна локација во епителните клетки; **г).** развој преку формирање на микро колонии или L-форми кои се дефицитни со клеточен сид; **д).** формираат биофилм и го излучуваат ензимот бета-лактамаза. (35, 45, 69). Zecconi A. et al. (2010) навеле дека и со строга примена на планот од пет точки во стадото првичните резултати во застапеноста на *S. aureus* ќе се установи после 10 месеци (33).

Одговорот на *Strep. agalactiae* према антибиотската терапија е добар, и каренцата е мала, млекото е неупотребливо само 24ч по третманот. Има економска исплатливост за лечење и во силно заразените стада, иако е установена негативна корелација помеѓу БСК и исходот од терапијата, како и колку кравата е помлада толку успехот е поголем (64, 68). Спротивно од *strep. agalactiae* во успехот на терапијата врз СМ предизвикан од *S. aureus* освен БСК и возраста на кравите, влијание има и

локацијата на четвртината, бројот на инфицирани четвртини и времетраење на инфекцијата. Предните четвртини полесно се излекуваат од задните четвртини, колку инфекцијата подолго трае толку успехот од терапијата е помал. Како и колку повеќе четвртини се инфицирани толку успехот за излекување е помал. Дополнително, овој причинител е проблем да се искорени од стадата во случаи кога БСК во лактофризерот е <200.000 кл/мл, (33, 38, 45).

Кога се работи за инфекција од овие два причинители, неминовна е соодветна примена на планот од пет точки во стадата. Задолжителната примена на овој план во Скандинавските земји дал значајни резултат во намалување на застапеноста на *Strep. agalactiae*. Но, поради непочитување на една од точките, односно, избегнување на задолжителното пресушување на кравите со антибиотик поради развојот на антимикробната отпорност, во последните години повторно се забележува зголемена застапеност на овој причинител во фармите (62). Дополнително Mweu M. M. et al. (2012) освен намалувањето на примената на антибиотици при пресушување на кравите, како причина за раст на застапеноста на овој причинител во Данска го истакнуваат зголемувањето на бројот на единки во стадата. Ова доведува до зголемување на потребата од дополнителна работна рака. Затоа во последниве години изолатите на *Strep. agalactiae* од СМ во Данска имаат човечко потекло (71).

Покрај примената на претходно наведениот план, во борбата со контагиозните причинители на СМ неопходна е имплементација на ригорозни протоколи за биосигурност со цел да се спречи воведување нови видови на заразни патогени М/О (69). Така на пример се препорачува воведување на следните мерки:

- Затворени стада што подразбира ограничен влез на нови единки (69)
- Задолжително носење на ракавици (69)
- Промена во режимот на молзење:
 - o Првин се молзат здравите крави,
 - o Крави со непознат статус,
 - o Крави со висок БСК, и
 - o Крави со хронични ИМИ (38, 69)

Во другите слични истражувања на нашето, пониска застапеност на *streptococcus dysgalactiae* било пријавено во Холандија, Полска, Германија и Република Чешка каде процентуалната застапеност се движела од 0.5-3.1% (130, 132, 114, 136) .

Поголема застапеност е пријавена во Финска и тоа 7.7%, додека во Шведска 15% (129, 21). Whist A. C. et al. (2007) наведуваат дека и после примената на сите контролни програми во Норвешка, *Streptococcus dysgalactiae* е втората најчесто изолирана бактерија после *Staphylococcus aureus* од СМ и КМ (142). Последните години тој процент се зголемува, а притоа причината сеуште останува непозната (142). Разликата во застапеноста на *Streptococcus dysgalactiae* во студите, од една страна зависи од методологијата и примената на контролните практики и хигиена, додека од другата страна од својствата на самиот причинител. Во истражување од Полска мострите биле земени една недела пред самиот акт на пресушување (132), каде Calvino L. F. et al. (1998) тврдат дека изолатите на *streptococcus dysgalactiae* добро растат во млекото добиено во рана и доцна лактација (143). Во Холандија, биле земени мостри само од 25% од кравите во фармата со висок и низок БСК, каде Sampion O. et al. (2009) наведуваат дека *streptococcus dysgalactiae* е почесто изолиран од кравите со низок БСК во однос на фармите со висок БСК во лактофризерот. (130). Во Република Чешка земањето на мостри било исто како и нашето од сите клинички здрави МЖ и од сите крави кој биле присутни на 16 фарми вклучени во студијата (136). Додека во Германија, се земени мостри од 80 фарми од секоја фарма по 32 крави после телење и пред самото пресушување (114). Најверојатно таквиот низок процент на застапеност на *Streptococcus dysgalactiae* се должи на ригорозни правила и практики кој се користат на фармите во Германија, каде за разлика од нас тие во 67 фарми задолжително користеле неселективно пресушување со антибиотик, додека 12 фарми користеле селективни пресушување само на кравите со висок БСК, и дополнително во 56 од 80 фарми кои биле вклучени во истражувањето секогаш кравите со КМ биле преместени во болнички оддел. Во истражувањето во Шведска биле вклучени 226 фарми, каде од секоја фарма се земало мостри од две крави и тоа една со висок БСК и друга која на последниот месечен тест за БСК за прв пат имала >200.000кл/мл, а не се водело евиденција во кој период од лактацијата (21). Ваквиот висок процент на застапеност кој е речиси трикратно повисок од нашиот (иако на нашите фарми многу малку се применуваат хигиенски практики при молзење) се должи поради системот на одгледување. Во Шведска 83% од фармите кои биле дел од истражувањето биле сместени во пуштен систем и молзени во молзилиште, додека останатите 17% имале роботско или комбинација на роботското молзење. (21).

Во нашата студија сите фарми беа со врзан систем и најчесто се применува слама или пилевина за простирка, а хигиената на фармата пред се зависеше од самиот одгледувач, додека во Шведска движењето низ коридорот до самото молзилиште не може лесно да се одржува и голем број на крави особено со ниска МЖ лесно се валкаат. Со ова се согласни и Taronen S. et al. (2017) кои констатираат поврзаност помеѓу слободниот систем на држење на кравите и застапеноста од *Streptococcus dysgalactiae* и *Strep. uberis*. (135). Во Финска истражувањето е обилно и добиениот процент е само од крави кој имале индикации за СМ т.е. висок БСК во месечниот извештај (135). *Streptococcus dysgalactiae* се однесува како заразен патоген во некои стада, додека во други како околински патоген каде заедно со *Strept. uberis* претставуваат сериозна закана за млечната индустрија (142). Негови резервоари се инфицираните МЖ, ѓубривото и други органски материи вклучувајќи ја и постелката. Особено е препорачлива примена на песок како постелка, во борбата со *Strep. dysgalactiae*. Но, сепак треба посебно да се внимава со примената на рециклиран песок. Во нашето истражување *streptococcus dysgalactiae* беше изолиран во 29% (n=7), од фармите, каде што во 5 фарми беше присутен како околински, додека во две како контагиозен причинител. Карактеристично за овој патоген е тоа што тој не предизвикува оштетување на клетките на МЖ на било која густина и одредена временска точка, како и дека *streptococcus dysgalactiae* може да преживее во млечните епителни клетки подолго време без да ја изгуби одржливоста или да се оштети самата клетка (144). Ова води кон развој на хронична инфекција и заштита на патогенот од одбраната на домаќинот и антимикробните лекови како и да си овозможи дополнителен пат за колонизација на субепителното ткиво (143).

Застапеноста на СМ предизвикан од лактококите во нашето истражување беше 6.2%, каде *lactococcus lactis* беше застапен со 4.9%, додека *lactococcus garviae* беше застапен со 1.3%. Двата вида, беа застапени на истите фарми, севкупно во 10 фарми (42%), а само кај една крава со две инфицирани четвртини со *lactococcus lactis*. Споредено со другите истражувања во однос на застапеноста на СМ предизвикан од лактококите воопшто не се прикажани како посебна група на причинители, освен ако истражувањето не е насочено конкретно за да се утврдат овие причинители. За ваквиот не заинтригиран однос кон нив постојат две причини. Примарно, лактококите пред се широко се користени како мезофилни стартер култури во млечната индустрија. Многу малку се проучувани и истражувани како причинители на болести, иако последните

години се се поприсутни како причинители на маститис кај говедата, клинички случаи кај луѓето и болестите кај рибите (145). Plumed-Ferrer C. et al. (2013) утврдиле дека лактококите кои потекнуваат од крави со маститис, иако се генотипски слични со starter културите, сепак имаат фенотипска разлика и тоа: поголема толеранција према температурата, лизозимот и жолчката, подобра адхезија за млечниот епител и поширок капацитет за ферментација на јаглехидратите. Претпоставуваат дека низ годините овие својства се имаат изгубено кај starter културите и тие карактеристики биле вкупно прифатени за сите лактококи како група. (145). Во нашето истражување ја потврдивме нивната присутност во млечните четвртини при трикратното земање на млеко како и силниот имунолошкиот одговор преставен преку БСК, каде просекот на БСК за *lactococcus lactis* и *lactococcus garvieae* беше 1.482.085 и 469.111 кл/мл. Секундарно, со тоа се согласуваат и Rodrigues M. X. et al. (2016) и Plumed-Ferrer C. et al. (2013) кои констатираат дека *lactococcus lactis* се тесно поврзани со стрептококите, ентерококите и аерококите. Со примената на дијагностички тестови врз база на фенотипски и биохемиски карактеристики големи се шансите тие цело време погрешно да се дијагностицирани и нивната процентуална застапеност како причинители на СМ да е занемарена (145, 146). Fortin M. et al. (2003) констатирале дека 11% од *enterococcus spp.*, 24% од *streptococcus uberis*, 3% од *streptococcus bovis* и 1% од *streptococcus dysgalactiae* биле всушност *lactococcus spp.* (147).

Во нашето истражување бидејќи користевме друг начин на дијагностицирање на причинителите на СМ, имавме соодветно препознавање на лактококите и прикажување на реалната присутност на овие бактерии како причинители на СМ. Ваквата ситуација докажува дека лактококите дефинитивно се етиолошки агенс на СМ и треба да се користат подобрени методи за нивно успешно дијагностицирање.

Ентерококите се дел од околинските предизвикувачи на маститис, тие се опортунистички бактерии кои се дел од нормалната физиолошка флора кај животните и луѓето (148). Но, може да бидат присутни и во почвата, површинските води и на растенијата и зеленчукот (149, 150). Имаат висока толеранција према неповолните услови во надворешната средина кои им овозможува долго опстојување (148, 149). Застапеноста на ентерококите во нашето истражување беше 3.8%, каде најфреквентен беше *enterococcus faecalis* 3%, и со по само еден изолат беа утврдени *enterococcus faecium*, *enterococcus avium*, *enterococcus pseudoavium* и *enterococcus raffinosus*. Во дел од истражувањата слични на нашето речиси воопшто и не се дијагностицирани

ентерококите како причинител на СМ (130, 131, 132). Ваквиот негативен наод може да е како последица на примената на протоколи кои се применуваат при актот на молзење, или воопшто не се истражувани ентерококите. Сепак, тие не претставуваат изразени патогени за СМ кај молзните крави. Во истражувањето во Франција и Финска, застапеноста на ентерококите била 3.1% и 1.2% и биле преставени само како група и не прикажани детално по видови (30, 129). Во истражувањето на Cervinkova D. et al. (2013) во Република Чешка пријавиле застапеност на Ентерококите од 12%, каде *enterococcus faecalis* бил доминантен со 6.6% , *enterococcus caecorum* 3.9% и *enterococcus solitaries* 1.5% (136). Во Кина тој процент бил 4.5% , каде се барал само *enterococcus faecalis*, во Германија 0.2% за *enterococcus faecalis* и *enterococcus faecium* (151, 114). Во Кореа застапеноста на ентерококите била 4.8%, каде *enterococcus faecalis* (n=47), *enterococcus faecium* (n=39), *enterococcus gallinarum* (n=6), *enterococcus avium* (n=6) *enterococcus hirae* (n = 50) и *enterococcus durans* (n=2) (152). Во сите студии вклучувајќи ја и нашата видлива е различна дистрибуција на видовите, што укажува сепак на индивидуална микрофлора на самата фарма, но сепак со доминантност на *enterococcus faecalis*. Ваквата состојба ја потврдува и Cariolato D et al. (2007) кои утврдиле значително повеќе детерминанти на вирулентност во *enterococcus faecalis* во однос на *enterococcus faecium* (150). Иако, процентот на застапеност на ентерококите е различен, Nam H. M. et al. (2010) наведуваат дека тој може да варира од 0-21.2% (152). Овој процент е повисок во истражувањата каде мострите на млеко се земени по случаен избор од кравите, без да има дополнителни индикации за нивно испитување, без да се испитува БСК. Користено е само еднократно земање на млеко проба, каде не се исклучува можноста за лажна позитивност поради изразената контаминација на боските со оваа група на бактерии. Иако, ентерококите не се изразено патогени за молзните крави, сепак загриженост постои за јавното здравје. Првично, од можност за пренесување од МЖ на луѓето и тоа преку консумирање на сирово непастеризирано млеко и млечни производи (148). Кај луѓето предизвикаат бактериемија и инфекции на уринарниот тракт, кожата, мекото ткиво, абдоменот и централниот нервен систем (149). Дополнително, ентерококите се карактеризираат со способност да се здобијат и да пренесат гени на антибиотска отпорност и на другите бактерии (152).

Просекот на БСК по крава од трикратно земање на млеко од сите истражени фарми беше 603.000 кл/мл. Chassagne M. et al. (2005) во Франција пријавиле просек во стадата со низок БСК 135, додека 265.000 кл/мл во стадата со среден БСК (153), Guarín

J. F. et al. (2017) пријавил БСК по крава 37 500 кл/мл, во Висконсин (154), додека Pamela L. Ruegg (2017) 194 000 кл/мл просек на БСК во лактофризерите во САД (179).

Различни автори прикажале различен процент на загуба во производството на млеко поврзано со БСК. Според Garcia R. R. et al. (2015) загубата била 2.5% во производството на млеко на секои 100.000 кл/мл, зголемување над основното ниво од 200.000 кл/мл (86). Ако овој податок го споредиме со нашите резултати, загубите на нашите фармери би биле пад на млеко продукцијата за 10% дневно. Dohoo I. R. et al. (1982) таа загуба ја претставиле во литри и би била 280 литри по крава за време на една лактација (18). Додека Hagnesten-Nielsen. C. et al. (2009) реферираат дека кога БСК бил >500.000 кл/мл, загубите во дневниот принос на млеко би изнесувале 3-9% кај кравите кои се во прва лактација (0.7-2 кг) или од 4-18% (1-3.7 кг) кај крави кој се породувале повеќе пати (155). Покрај намалената продукција, потврдено е и влијание на високиот БСК врз составот на млекото што го потврдуваат повеќе автори (85, 87, 88, 89).

Дополнително, неминовно е да се укаже на влијанието на БСК врз јавното здравје. Според европските регулативи, како и според правилникот издаден од Агенцијата за храна и ветеринарство во Р. С. Македонија (Службен весник на РМ, бр. 26 од 21.2.2012 год) укажуваат дека за исправно млеко се смета млекото кое го исполнува критериумот т.е. БСК < 400.000 кл/мл по фарма. Млекото кое не го исполнува овој критериум треба да се користи за производство само на тврди млечни производи со период на зреење од 60 дена (156). Иако истражувањето е направено на мал број на фарми, но сепак тие се избрани по случаен избор и се еден вид репрезент, каде укажуваат дека во иднина потребна е обемна студија и конкретни пресеци за причинителите на СМ.

Долго време се испитувало дали млекото со висок БСК т.е. ингестијата на бовините неутрофили се ризик за здравјето на конзументите. На симпозиум на National Mastitis Council (2005) при прегледот на литературата било сумирано и презентирано следново:

- нема никакви податоци кој укажуваат дека консумацијата на млеко со висок БСК директно влијае врз здравјето на конзументот, ниту пак од производите направени од млеко со висок БСК;
- најголем ризик од млекото со висок БСК за здравјето на луѓето е консумирање на непастеризирано и неправилно пастеризирано млеко;

- пастеризацијата го намалува бројот на различни микроорганизми но често не го негира ефектот на токсините произведени од маститис патогените М/О. Преносот на термо стабилни токсини произведени од маститис патогени М/О во млекото се потенцијална опасност. Ентеротоксинот произведен од *S. aureus* во млекото од инфицираните крави е вмешан во случаевите со труење на храна.
- БСК во лактофризерот е индикатор за хигиената на фармата и е потенцијален ризик за здравјето на луѓето. Голема и разновидна група на хумани патогени кои живеат во околината на кравите вклучувајќи ги *salmonella dublin*, *campylobacter jejuni* и *listeria monocytogenes* кои се често патогени или нормална флора на кравите, кои се јавуваат за време на молзењето или после него и не мора да потекнуваат од ИМИ.
- Евидентирани се прикази дека *Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis* е поврзана со пара туберкулозата (ценова болест) кај кравите е изолирана од хуманите пациенти со кронова болест и може да преживее во некои од прифатените процедури за пастеризацијата на млекото. Иако е можна поврзаност помеѓу прелевањето на *Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis* во млекото и последователно преживување на пастеризацијата е огромна, стапката на прелевање е ниска кај инфицираните крави и не е поврзана со зголемување на БСК (141, 157).

Негативните последици од високиот БСК се индиректни, каде поради зголемување на ензимската активност во млекото се добива финален производ со пократкиот рок на траење, промени во осетливоста на содржината или не пожелни карактеристики (6, 23). Повисокото ниво на слободни масни киселини со краток синџир во млекото даваат солен и горчлив вкус (5, 23), а индиректно може да ги инхибираат стартер културите во производството на сирење и јогурт како и може да го пренесат горчливиот вкус на овие производи (5, 18). Fernandez. A. M. (2007) го истражувал влијанието на БСК во млекото врз квалитетот и трајноста на јогуртот кој е произведен од млеко со низок, среден и висок БСК: 147.000 кл/мл; 434.000 кл/мл и 1.943.000 кл/мл. Тој констатирал дека на 30^{от} ден од подготовката на јогуртот, се зголемила вискозноста само на јогуртот произведен од млеко со висок БСК, што може индиректно да резултира со намалување на рокот на самиот производ (84). Sharma N. et al. (2011) во својот преглед навеле дека со намалување на БСК во млекото од 340.000 на 240.000 кл/мл се зголемува производството на сирење за 1%, додека пак

намалувањето на БСК во млекото од 640.000 на 240.000 кл/мл го зголемува приносот на сирењето за 3.3% (23). Исто така, поради слабата коагулација на сметка на изменетиот млечен протеински состав, зголемена рН и минерална диспропорција (*особено намалената концентрација на калциумот*) доведува до зголемена влажност на самото сирење и негов послаб квалитет (17, 76). Ma et al. (2000) ја дефинирале поврзаноста помеѓу високиот БСК и квалитетот на пастеризираното млеко. Тие утврдиле дека промените во млекото, поврзани со развојот на маститисот предизвикуваат влошување на квалитетот на вкусот и рокот на употреба на млекото после пастеризацијата. Предложиле, преработувачите на сурово млеко да користат млеко со низок БСК кога се бара подолг рок и квалитет на млекото со над 14 дена складирање (158). Дополнително, високиот БСК во лактофризерот е врзан со резидуи на антибиотик во млекото (83).

Ваквата состојба укажува кон што побрз и сериозен пристап. Од една страна ќе треба да се едуцираат и самите фармери кон нови навики и протоколи со цел добивање на млеко со што помал БСК. Од друга страна операторите со млеко ќе треба да ги субвенционираат фармерите кои ќе произведуваат млеко со екстра квалитет и да го класифицираат млекото при откуп. И, од трета страна вклучување на релевантните институции на државно ниво со тековни истражувања и стратегии, како и формирање на бази за состојба на БСК по крава и класификации на фармите према квалитетот на самото млеко. На тој начин многу полесно би имале следливост и контрола над самите крави, а индиректно би влијаело на намалување на застапеноста на СМ.

При анализа на поврзаноста на БСК со класификацијата на четвртината според застапеноста на соматските клетки и изолацијата на причинителите се утврди дека не може да се направи јасна дистинкција помеѓу групите со и без детектиран причинител како во групите (V и M) со >200.000 кл/мл, исто така и помеѓу групите (B и N) т.е со <200.000 кл/мл. Ова произлегува од наодите на бактериолошки позитивните четвртини, во кои 22% потекнуваат од четвртини кој дале БСК <200.000 кл/мл, додека 19% од бактериолошките позитивни четвртини потекнуваат од четвртини чиј БСК бил од 200.000-400.000 кл/мл. Во слично истражување како нашето, Souza N. F. et al. (2016) утврдиле 13% бактериолошки позитивен наод во четвртини кој имале БСК <100.000 кл/мл, додека 17 % биле бактериолошки негативни од четвртините кој имале БСК > 200.000 кл/мл (159). Карактеристичен податок е што и најпатогените причинители на СМ биле детектирани во четвртини со БСК 44.000, 42.000 и 15.000 кл/мл за *Strep.*

agalactiae, *Staph. aureus* и *Strep. uberis*. Ова укажува дека БСК не може да се употребува како индикатор за присутност на инфекција во четвртината. Ваквите податоци добиени во нашата студија укажуваат дека само лимитот од 200.000 кл/мл не е идеална дијагностички алатка која со сигурност може да ги разликува инфицираните од не инфицираните четвртини. Pyörälä S. (2003) наведува дека со примена на индиректните тестови може да се дојде до погрешна класификација која се движи од 25-50%. (160). Ваквите резултати укажуваат дека можеби доколку се користат само БСК како индикатор за СМ тој лимит би требало да се спушти уште подолу со што би се намалил бројот на лажно негативните четвртини. Секако ова важи за мострирање на ниво на четвртина, а не на цела МЖ. Forsback L. et al. (2009) наведуваат дека поради разрежувањето и кога БСК бил < 100.000кл/мл на ниво на МЖ, 10% од четвртините од овие крави имале по една четвртина инфицирана (87). Со ова се согласни и други автори, Kovachevich S. B. et al. (2009) кои предлагаат дека БСК < 50.000 кл/мл е здрава четвртина, додека Sharma N. et al. (2011) и Pyörälä S. (2003) за лимит го предлагаат БСК < 100.000 кл/мл. (23, 160).

Просечниот БСК за најчестите причинители во нашето истражување беше највисок за *Strep. agalactiae* (2.065.452 кл/мл), *Staph. aureus* (1.577.202кл/мл), *Strep. uberis* (1.406.091кл/мл) и *CoNS* (735 241кл/мл). Овие наоди се во согласност со изведената анализа на Djabri B. et al. (2001) во која користејќи 21 различно истражување утврдил просечни вредности на БСК за *Strep. agalactiae* (3.792.000кл/мл), *Staph. aureus* (1.426.000кл/мл), *Strept. uberis* (2.065.000кл/мл) и *CoNS* (475.000кл/мл), додека Tomazi T. et al. (2015) пријавиле 315.300 кл/мл, но само за *Staph. chromogenes* како претставник од групата *CoNS* (80, 58). Поради широките опсези на БСК од четвртините каде е изолиран ист причинител, како и БСК од четвртините каде е изолиран друг причинител утврдени се препокривања на БСК што укажува дека само со БСК по четвртина не можеме да го одредиме самиот причинител.

Во однос на микробиолошкото трикратно тестирање на ниво на четвртина утврдивме неколку правила. При споредба на резултатите само од првото земање со финалната класификација (*компарација на трикратното тестирање и различниот CFU*) констатиравме дека 95% од микробиолошки негативните четвртини и финално биле прогласени како негативни. Четвртините кои при првото земање на млекото дале микробиолошки наод cfu >50/0.01мл (С), 74% од нив финално биле класифицирани како позитивни. При споредба помеѓу двете последователни тестирања и финалната

класификација на четвртината, 89% од четвртините завршиле како позитивни кога на двете тестирања имале $>50 \text{ cfu}/0.01\text{ml}$ (CC). Седумдесет и пет проценти од четвртините прогласени се како позитивни кога на последователните две тестирања дале $>50 \text{ cfu}/0.01\text{ml}$ и $10\text{-}50 \text{ cfu}/0.01\text{ml}$. (CB), и со 72% со позитивен наод како финален резултат завршиле четвртините кои на двата последователни микробиолошки теста дале $\text{cfu } 10\text{-}50/0.01\text{ml}$. Во резултатите од трикратното тестирање се утврди дека финално негативна класификација имаат четвртините што во две од три тестирања се со негативен микробиолошки наод (N), а само во случаите каде нема негативен наод се утврди и финален позитивен наод. Сепак треба да се има во предвид дека при оваа анализа се добија различни комбинации на трикратните тестирања со мал број примероци по комбинација и истите не можеа да бидат предмет на посеопфатна анализа.

Добиените податоци од микробиолошките анализи укажуваат дека има изразено висок процент на усогласеност во наодите при единечно земање примерок и финалниот резултат од трикратното тестирање. Со овој податок е согласни и Dohoo I. et al. (2011) каде укажуваат дека трикратно земање на примерок ја дава најдобрата комбинација на сензитивност и специфичност, но во споредба со единечното мострирање се обезбедува минимална скромна добивка. Сепак се уште како единствен златен стандард се смета трикратното земање на примерок млеко (161).

Дефинитивно, изолирањето на причинителот и БСК можат да се гледаат како два одвоени фрагменти. Andersen S. et al. (2010) наведуваат дека БСК е одговор на воспалението на инфицираните четвртини, но не и нужна инфекција на МЖ, и обратно, изолирањето на причинител не значи по секоја цена инфламација на самата четвртина. (162). Висината на БСК пред се зависи од типот на причинителот, имунолошкиот статус на кравата и степенот на оштетувањето на жлезденото ткиво. Од друга страна високиот БСК може да доведе до само излекување на четвртината каде треба подолг период да помине за да се нормализира актот на воспаление Souza N. F. et al. (2016) (159).

Неминовна е интегрираност на микробиолошкиот преглед и БСК во програмите за контрола на СМ. Према цитираната литература и добиените наши резултати, во ерадикацијата на СМ на нашите фарми, првично се препорачува користење на БСК, при што примероците млеко со $<50.000 \text{ кл/мл}$ би укажувале на негативна четвртина, додека за останатиот дел од четвртините ќе биде потребно дополнително

бактериолошко испитување. Четвртините кои при бактериолошкото тестирање имаат $\text{cfu} > 50 / 0.01\text{ml}$ би се прогласиле за позитивни, а за останатите четвртини да се препорача континуирано следење на БСК.

Клучните стратегии за контрола на маститисот мора да вклучат ефикасни методи за да се спречи развојот на нови инфекции и да се елиминираат постојните инфекции (96). Сметајќи ја хигиената како еден од факторите за инфекција на МЖ со околински маститис патогени причинители или нејзиниот значаен сегмент во пренесувањето на контагиозните причинители, во истражувањето извршивме хигиенска проценка на поедини делови на телото при што се утврдија следните средни оценки: МЖ: 1.9, млечно огледало: 2.4, нозете: 2.6, бут: 3.1 и слабина: 2.2.

Jeffrey K. R. et al. (2005) утврдиле изразено повисока средна вредност на хигиенската оценка на нозете (оценка од 3.2), додека останатите средни оценки од телото се движеле од 2.3 до 2.6. (163). Споредено со нашите истражувања, овие автори генерално имаат наод на повисоки оценки, најверојатно поради следните причини: користеле петостепен систем за оценување, ја оценувале и хигиената на коренот од опашката, употребиле една вкупна оценка за целата МЖ. Слично и Tongel P. et al. (2010) користеле петостепен систем на бодување, но во овој случај ги оценувале само нозете и МЖ каде добиле средна вредност 2 и 1,9 (20). Додека со ист систем на бодување како нашиот работеле Schreiner D. A. et al. (2003) но само ја оценувале хигиенската оценка на МЖ и нозете и добиле средни вредности и тоа 2.09 и 2.33 (96). Споредувајќи ги резултатите помеѓу различните студии, вклучително и нашата, за хигиенската оценка на нозете и МЖ се утврдуваат прилично слични податоци. Исклучок е истражувањето на Jeffrey K. R. et al. (2005) (163) во кое хигиенската оценка за нозете е далеку повисока и од нашата оценка (3.2) - која пак е многу повисока од истражувањата на Tongel P. et al. (2010) и Schreiner D. A. et al. (2003) (20, 96). Сепак, треба да се има во предвид дека нашето истражување е изведено на фарми со врзан систем на одгледување, а исто така ние работевме на поголем број на фарми со помал број на крави, спротивно на фармите во другите истражувања. Од овде, може да се извлече заклучок дека хигиенската оценка на МЖ помеѓу различните системи на одгледување е независна од системот, а хигиенските оценки најверојатно се должат на разликите во секојдневните практики во подготовката на МЖ за молзење, а не на системите на одгледување. Хигиенската оценка на бутот во нашата студија е повисока (3.1) во однос на истражувањето на Jeffrey K. R. et al. (2005) каде таа оценка беше 2.3

(163). Висината на хигиенските оценки на останатите делови од телото, вклучително и бутот, е под влијание менаџментот на фармата, конзистенцијата на изметот и зачестеноста на чистење на фармите, што го потврдуваат и Schreiner D. A. et al. (2003) (96). За врзаниот систем на одгледување према добиените наши резултати најзасегнат со највисока оцена е бутот, па нозете и млечното огледало, додека за пуштениот систем на одгледување засегнат е само дисталниот дел од нозете па потоа МЖ, која најверојатно страда како последица од високата хигиенска оценка за нозете (96). И Sant Anna A. C. et al. (2011) наведуваат дека валканите нозе се врзани со валканите патеки и брзото движење на кравите према молзилиштето, валканата слабина е врзана со валкано лежиште, додека валканата опашка со фекалната конзистенција, валканите боски и МЖ се резултат на сите овие претходни набројани фактори (95). Особено за врзаниот систем најголемо значење ќе има зачестеноста на чистењето на лежиштето и користење простирка, бидејќи со ваквиот систем на одгледување кравата во истото место дефецира, лежи и се молзе, немајќи друг избор. Sant Anna A. C. et al. (2011) во своето едно годишното истражување на хигиенската оцена во различни сезони во текот на годината во фармите со пуштен систем на одгледување утврдиле дека 45.8% од кравите во стадото се постојани чисти и многу чисти во текот на целата година, а 9.8% се константно валкани (95). Иако, ние не ги истражувавме карактеристиките на индивидуалните боксови на сместување во врзаните системи, сепак Zurbringg K. et al. (2005) констатирале дека со подигање на попречната вратна гредка за 2.5 cm се зголемува оцената за чистотата на МЖ за 0.2 %, додека со зголемување на должината на ланецот за врзување за 2.5 cm се намалува процентот на валкани нозе за 1.4% (164). Дополнително, истите автори наведуваат дека пократките лежишта доведуваат до повисок број на крави со валкани нозе. Кратките лежишта ги принудуваат кравите да стојат дијагонално или со задните нозе во каналот за изгубрување. Кравите би имале поголеми шанси да легнат директно во каналот за изгубрување каде уринираат и дефецираат, односно млечното огледало и бутот постојано да се во контакт со самото губре (164). Исто така Jeffrey K. R. et al. (2005) наведуваат дека постарите и пресно отелените крави се повеќе склони кон валкани МЖ и тоа кај првите поради по ниско спуштената МЖ, додека кај вторите поради поголемиот внес на сува материја и производство на губриво со послаба конзистенција (163).

Ваквите резултати добиени од нашите фарми, споредени со податоците од другите истражувања укажуваат кон што поскоро трансформирање на нашите фарми

од врзан систем кон фарми со пуштен систем со цел максимално искористување на придобивките од пуштениот систем на одгледување како и потенцијалот кој го поседува самата крава.

Здравствениот статус кај кравите со висока продукција на млеко е нестабилен и мала грешка може да предизвика болест (20), при што лошата хигиена на кравите и околината може да бидат поврзани со зголемената појава на болести, пред се маститисот предизвикан од околинските патогени М/И (95). Од нашите добиените резултати, при споредба на хигиенските оценки од испитуваните области од телото со БСК на ниво на крава не утврдиме значајност во нивното поврзување, освен забележавме повисоки вредности на БСК во однос на оцената 4 за нозете, која сепак не беше статистички значајна. Од друга страна, во истражувањето од Jeffrey K. R. et al. (2005) од испитувањето со петостепен систем на оценување на пет различни области од телото статистичка значајност врз БСК добиле само од хигиенската оценка на нозете и МЖ, каде утврдиле дека за секоја промена на хигиенската оценка на нозете и МЖ, БСК во лактофризерот би се зголемил за 40.000-50.000 кл/мл (163). Исто така и во истражувањето на Schreiner D. A. et al. (2003) утврдено е линеарно зголемување на БСК со зголемувањето на хигиенската оценка и на нозете и на МЖ (96). Тие добиле поврзаност помеѓу хигиенската оценка на МЖ и СМ предизвикан од контагиозен причинител и тоа за секоја хигиенска оценка (1-4), застапеноста значајно се зголемувала 2.8, 4.7, 5.1 и 7.4%, исто така, значајна зголемена застапеност добиле и за СМ предизвикан од околинските патогени М/И каде за секоја оценка (1-4) застапеноста била 9.7, 9.6, 12.1 и 13.8%. Во однос на поврзаноста на хигиенската оценка на нозете со застапеноста на СМ од контагиозните и околинските маститис патогени М/И, иако се зголемува со зголемување на хигиенската оценка, но сепак овие автори не утврдиле статистичка значајност (96). Исто така Marcela de Pinho M. et al. (2011) утврдиле поврзаност помеѓу хигиенската оценка на МЖ и застапеноста на СМ, но без значајност помеѓу контагиозните и околинските причинители (119). Тие констатирале и специфично намалување на БСК со зголемување на хигиенската оценка, што е спротивно бидејќи БСК го прати СМ, што не се случило во истражувањето.

Прикажаните истражувања донекаде даваат слични и очекувани податоци со оглед на тоа што МЖ и нозете се делови од телото кои се постојано изложени на ѓубриво. Сепак, нашето истражување не ја утврди таа поврзаност, спротивно, се констатира позитивна статистичка значајност помеѓу чистота на млечното огледало и

застапеноста на СМ. Споредено со наброените претходни истражувања, отсуството на значајна поврзаност на хигиената со СМ и БСК во нашето истражување може да се должи на:

- **Непознат претходен здравствен статус.** Во нашето истражување користевме стада со врзан систем, со воопшто не познат здравствен статус на МЖ, за разлика од Jeffrey K. R. et al. (2005) кои истражувањето го направиле на фарми каде што немало присуство на контагиозни причинители на СМ и кравите кои на двата последователни месечни извештаи за БСК имале >200.000 кл/мл биле изземени од истражувањето, каде при ваквата состојба можат многу полесно да ја најдат поврзаноста помеѓу хигиенската оцена, БСК и околинските маститис патогени (163).

- **Високата застапеноста на СМ.** На фармите во нашето истражување имаше висока застапеност на СМ со опсег од 42-100%, додека застапеноста на СМ од контагиозните и околинските причинители во истражувањето на Schreiner D. A. et al. (2003) биле од 0-21% и 3.8-17.6%, додека стадото кое учествувало во истражувањето морало да биде со БСК <500 000 кл/мл во лактофризерот (96).

Примена на различни хигиенски практики во подготовката на МЖ за молзење. Marcela de Pinho M. et al. (2011) наведуваат дека применувањето на соодветна рутина пред молзењето е превентивна мерка против појавата на ИМИ (119). Schreiner D. A. et al. (2003) наведуваат дека фармите со посилна санитација и хигиенска практика имале помала инциденца на КМ во однос на фармите со порелаксирани практики, како и примената на дезинфекција на боските пред молзење е значително поврзана со БСК во лактофризерот (96). И покрај сите применети мерки, Chassagne M. et al. (2005) укажуваат на можен пропуст ако редовно не се заменуваат растворите за потопување во чашките и доколку самите чашки не се чистат со силни дезинфекциони средства за да се спречи трансферот на инфекции од крава на крава (153). Тие додаваат дека во присуство на органска материја ефикасноста на хлорните средства за дезинфекција против *S. aureus* е намалена, а органскиот материјал додаден во средствата за дезинфекција доведува до формирање на нуспроизводи кои овозможуваат размножување на бактериите (153). Во нашето истражување само на две фарми се користеше потопување на боските после молзење, но на ниту една не се применуваше дезинфекција пред молзење. Можеби причината за позитивна корелација помеѓу чистото млечно огледало и застапеноста на СМ е токму во овој процес.

Млечното огледало во нашето истражување, после бутот и слабината, е највалканата област од телото т.е кога кравите лежат поголем дел од млечното огледало е во директен контакт со самиот под. Пред да почне актот на молзење, фармерите се приморани да го исчистат тој дел, каде дел од изметот се слева према боските, а притоа дополнително не се бришат со сува крпа, ниту пак се применува некаква дезинфекција.

Контролата на СМ зависи од идентификување и елиминација на факторите на ризик поврзани со животната средина, управувањето со фармата и индивидуалното животно. Најчесто, факторите на ризик се елиминираат со воведување на добро управување и хигиенски мерки, но сепак и изборот на млечни крави кој се помалку подложни на маститис е достојна мерка за разгледување (165). Хиперкератозата е израз кој се користи за да се опише задебелен мазен прстен или протрузиран кератин околу отворот на боската (166). Интегритетот на овој отвор е неминовен во заштита на млечната четвртина од бактериската инвазија (167).

Emre B. et al. (2015) навеле дека застапеноста на хиперкератозата на боските кај кравите кои се молзат машински варира од 22-54% (168). Сепак од Teat Club International, Mein. G. A et al. (2001) за задоволително ниво на оштетување на крајот од боските по стадо не треба да премине за $R(3) + VR(4) > 20\%$ или само за $VR(4) > 10\%$ (169, 120, 170). Во нашето истражување резултатите од оштетувањето на врвот од боските е 73% ($n=1.098$), од кои оценети со N (1) беа 18% ($n = 266$), со S (2), 6.5% ($n = 98$), оценети со R (3) и 2% ($n = 32$) оценети со VR (4). Поединечениот и взамен збир од оштетувањето на боските беше далеку под препорачаното дозволено оштетување на боските. Во слични истражувања на нашето, со примена на ист степен на оценување, се добиле следниве резултати и тоа: за N (1) со опсег од 30-70 %, за S (2) опсегот се движел од 11-52%, за R (3) опсегот бил од 12 до 22 %, додека за VR (4) опсегот се движел од 2 до 18% (97, 120, 154, 167). Сите наведени истражувања укажуваат дека имаме прилично слични резултати за највисокиот степен на оштетувањето на боската, освен со истражувањето на Manzi M de P. et al. (2012) каде тој процент е далеку повисок од сите (97). Додека за вториот и третиот степен на оштетување на боските (S и R) процентите се со изразено големи варијации помеѓу сите студии. Причината за хиперкератозата е се уште не дообјаснета. Наведени се голем број на фактори кои можат да влијаат на појавата на хиперкератоза. Карактеристично во однос на нашето истражување во споредба со останатите е тоа што оценувањето е направено на 24

различни фарми, сите со врзан систем и ниту на една фарма не најдовме статистичка значајност дека има изразено отстапување во застапеноста на хиперкератозата. Иако, помеѓу фармите несомнено постоеја различни специфики на системите на молзење, што би иницирало хипотеза за влијание на системот на молзење врз појавата на хиперкератозата. Ваквото видување може да се толкува дополнително што хиперкератозата е констатирана и при рачно молзење (171, 172). Спротивно од нашата студија, останати имале пуштен и слободен систем на одгледување при што и промената на времето и ветерот може да влијаат врз кожата на боските. Со ова се согласни Sandrucci A. et al. (2014) каде во своето истражување наведуваат дека сезоната влијае врз хиперкератозата на боските, односно, пролетта и есента во Италија се карактеризираат со висока влажност во животната средина што придонесува за присуство на кал на боските, а калта ја намалува влажноста на боските и тие стануваат помалку еластични и пукаат (120). Временските услови и климата како причина за хиперкератоза ги наведуваат и Emre B. et al. (2012), Asadpour R. et al. (2015), Guarin J. F. et al. (2017)(168, 166, 170).

Во нашето истражување само на две фарми се применуваше потопување на боските после молзење и тоа не континуирано, што е различно од наведените истражувања каде потопувањето на боските е задолжителна хигиенска практика после молзењето. Иако примената на дезинфекционите средства е неминовна практика во превентивата од маститисот, сепак тие имаат и хемиско иритантно дејство (120), кое може да е дополнителна причина за ниската хиперкератоза во нашето истражување (169). David E. G. et al. (2004) во компарација на примена на средства за дезинфекција само на левите четвртини од 56 крави кои биле предмет на испитување, констатирал дека третираните четвртини имале понизок БСК но повисока средна оцена за хиперкератоза, додека добил спротивен резултат за не третираните четвртини т.е. пониска средна оцена за хиперкератозата, а повисок БСК (172).

Со споредените истражувања, најблиски резултати во однос на боските оценети како негативни (N) имаме со истражувањето на Guarin J. F. et al. (2017) (170). Но да се напомене дека нивното истражување е спроведено само на крави кои се само еднаш отелени, и староста на кравите е веќе востановен фактор за хиперкератоза, така што Juozaitiene V. et al. (2019) наведуваат дека таа е поизразена кај кравите кои се породувале повеќе од 5 пати (167). Покрај староста и фазата во тековната лактација се истакнува како фактор односно хиперкератозата постојано се зголемува до 4-5 месец

после отелувањето, а потоа постепено се намалува (171). Исто така, како дополнителна причина за хиперкератозата се истакнуваат и анатомската предиспозиција, каде острите врвови се повеќе склони кон хиперкератоза (173); и машинското молзење т.е. протокот на млеко низ отворот на боската кога е <1 кг/мин доведува до подолго и побавно молзење, а тоа резултира со оштетување на самиот отвор (169).

Според Neijenhuis F. et al. (2001) и Juozaitiene V. et al. (2019) кои укажуваат дека боските со повисок степен на хиперкератоза се во значителна корелација со појавата на КМ (173, 167). Додека во однос на поврзаност на степенот на хиперкератоза и БСК и/или ИМИ, студиите се поделени. Во нашето истражување утврдивме значајно повисок БСК кај боските со R (3) и VR (4) степен наспроти оние со N (1) и S (2) степен на хиперкератоза. Исто така се утврди зависност на степенот на хиперкератозата со застапеноста на СМ т.е колку е поголем степенот на хиперкератоза толку таа боска е повеќе склона кон инфекција, со тоа што помеѓу V (3) и VR (4) оштетувањето немало значителна разлика. Ваквата взаемна следливост на ИМИ и БСК е очекувана, бидејќи пред се БСК драстично се зголемува како последица на влез на инфекција во самата четвртина. Повисокиот степен на хиперкератоза доведува до отежнато чистење и ограничување на ефектот на дезинфицирање на боските после молзењето (119). David E. G. et al. (2004) наведуваат дека боските со оштетен крај, каде се задржуваат капки млеко им овозможуваат соодветна средина за колонизација на маститис патогените бактерии, каде 50% од биопсиите на хиперкератинските боски биле колонизирани од грам позитивни бактерии во *stratum corneum* (172). Guarin J. F. et al. (2017) утврдиле поврзаност само помеѓу највисокиот степен на хиперкератоза (VR) и БСК (154). За разлика од нас тие за прогласување на четвртината за позитивна на СМ користеле праг >150.000 кл/мл, што е помал од нашиот, како и месечниот просек на БСК во фармите каде се одвивало истражувањето е 37.500 кл/мл, кој е многу низок во споредба со нашиот. Со сличен наод се и Emre B. et al. (2012) кои утврдиле значителен пораст на БСК паралелно со зголемување на степенот на хиперкератозата, додавајќи дека зашилените боски имаат поголема склоност кон хиперкератоза (168).

Во истражувањето на Bhutto L. A. et al. (2010) и Manzi M de P. et al. (2012) констатирано е зголемување на застапеноста на ИМИ во четвртините соодветно на зголемување на степенот на хиперкератозата (165, 119). Ваквиот податок е согласно со нашите добиени резултати во однос на ИМИ. Manzi M de P. et al. (2012) наведуваат дека со секој зголемен степен на хиперкератозата се зголемува шансата за ИМИ за

30%. (119). Bhutto L. A. et al. (2010) забележале и не статистички значајна поврзаност помеѓу (VR) 4 степен на хиперкератоза и застапеноста на ИМИ предизвикана од *S. aureus*, *E. coli*, *CoNS*, *Strep. uberis* и *Strep. agalactiae*, но не и со *Strep. dysgalactiae* (165), спротивно од нас каде не утврдивме поврзаност помеѓу одреден маститис патоген причинител и степенот на хиперкератоза. Asadpour R. et al. (2015) и Manzi M de P. et al. (2012) не констатирале никаква поврзаност и помеѓу контагиозните и околинските патогени М/О и степенот на хиперкератоза (166, 119). Но, спротивно од нашите наоди тие не констатирале ниту поврзаност со БСК, каде односот помеѓу БСК и ИМИ е добро познат т.е БСК се зголемува како последица на инфекција на самата четвртина. Тие освен што не добиле статистичко зголемување на БСК, туку Manzi M de P. et al. (2012) констатирале и намалување на БСК за вториот степен на хиперкератоза во однос на БСК за првиот степен (119), а Bhutto L. A. et al. (2010) добиле и понизок БСК за вториот и третиот степен на хиперкератозата во однос на првиот степен на хиперкератоза (165).

Прикажаните резултатите добиени од истражувањата од веќе цитираните автори укажуваат кон несвојствена корелација помеѓу БСК и ИМИ од една страна со степенот на хиперкератоза од другата страна. Ваквата состојба, во иднина бара дополнителни истражувања кој ќе бидат концизни и унифицирани во сите постапки т.е при прегледот на самите боски, начинот на собирање на мострите како и нивното толкување. Односно, само на таков начин може соодветно да се оцени влијанието на хиперкератозата врз БСК и ИМИ, т.е. дали само хиперкератозата влијае врз застапеноста на СМ или дополнително се вклучуваат и дополнителни фактори кој можат да влијаат појават на СМ (*околина, хигиенски практики при молзење, здравствена состојба на кравите итн*).

Спротивно на нашите резултати и резултатите од претходно наведените истражувања David E. G. et al (2004) и Sandrucci A. et al. (2014) не констатирале никаква поврзаност помеѓу степенот на хиперкератоза и БСК, односно хиперкератозата не ја гледаат како фактор за појава на СМ (172, 96). David E. G. et al (2004) во својата студија од два експеримента, каде во првиот експеримент не утврдиле поврзаност помеѓу БСК и степенот на хиперкератоза. Најверојатно ваквиот исход е поради премногу нискиот процент на хиперкератоза со оцена VR (4) (0.5%), и високиот стандард кој се применувал при молзење. Додека во вториот експеримент на компарација на хиперкератозата и БСК, каде на боските од десната страна се применувало

дезинфекција по молзењето, додека од левата страна не се применувала дезинфекција, утврдиле очигледна корелација помеѓу хиперкератозата и БСК во отсуство на дезинфекција на боските (172). Од друга страна, Sandrussi A. et al. (2014) во својата студија на 15 различни фарми во Италија со низок БСК во лактофризерот, ја занемаруваат хиперкератозата како фактори за СМ, но сепак констатираат дека колку поголем број на превентивни хигиенски практики се применуваат на фармата, толку е понизок БСК во истата (120). Поточно применетите практики како: исфрлање на првите млазови, потопување на боските пред молзење и потопувањето на боските после молзењето, иако чинат многу време и пари сепак спречуваат развој на нови ИМИ и преносливост на инфекција од боска на боска и/или од крава на крава.

Бројот на бактерии на кожата од боските е индикативен за зголемена потенцијална изложеност. Но, сепак и други дополнителни механизми најверојатно се неопходни оваа изложеност да резултира во ИМИ. Освен имунолошкиот статус на самата крава и управувањето со кравите и околината, голем удел како ризик фактор во појавата на маститисот има и морфологијата на млечните четвртини т.е МЖ. Неколку претходни студии укажуваат дека млечните четвртини се независни една од друга и постои еднаква веројатност да се зарази било која четвртина (174, 175). Со ова се согласни и нашите резултати каде констатираме дека сите четвртини под еднакво се склони кон инфекција, каде не се забележаа статистички значителни отстапки во ниту една четвртина во односот на четирите класификации (В, М, V и N) на сооднос на БСК и ИМИ, како и соодносот предни према задни четвртини. Но, сепак застапеноста на СМ (М, В и N) во однос на задните према предните четвртини, процентуалната застапеност беше 52% према 48%, додека на ниво на четвртина највисоката застапеност на СМ е идентификувана во 3Л четвртина со 28%, а најниска застапеност имаше во ПЛ четвртина и тоа 23%. Исто така, при компарација на четирите најчести изолирани причинители споредено со локацијата на четвртината не се утврдени статистички значајни отстапки, освен *CoNS* кои покажаа значително повисока застапеност во 3Л четвртина. Спротивно од нас, Ndahetuye J. B. et al. (2019) констатираа поголема застапеност на СМ на задните (46%) во однос на предните четвртини (44%) (137). Слични резултати добиле и Metodija T. et al (2010) каде добиле застапеност на СМ во однос на задните и предните четвртини 61% наспроти 39%, како и разлика на ниво на четврт каде тој сооднос бил ПЛ, ПД, 3Л и 3Д 18%, 21%, 23% и 37% (176). Резултатите од овие испитувања се добиени врз основа на примена на КМТ

и бактериолошка изолација само од КМТ позитивните четвртини. Спротивно од нив врз основа на друга методологија Slyzius E. et al. (2014) констатирале статистички значајни промени како за БСК така и за ИМИ т.е. 73.000кл/мл имало повеќе во задните отколку во предните четвртини, додека бактериолошка изолација на причинителот била 36% во предните додека 51% во задните четвртини (8). Овој податок статистички го потврдува и Berkema H. W. Et al. (1997) (177), додека Donagh P. B. et al. (2006) констатираат дека ПЛ четвртина е најмалку склона кон ИМИ во однос на останатите четвртини (175).

Од една страна, повисоката застапеност на СМ во задните четвртини може да се должи на нивната морфолошка структура и пониска позиција до подот што ги прави по склони кон повреди и оштетувања (175, 174). Додека од друга страна и повеќето автори Slyzius E. et al (2014), Guarin J. F et al. (2017), Slyzius E. et al (2013) констатирале дека предните боски се подолги од задните, каде можеби на тој начин е по отежнат т.е. подолг и самиот пат на бактериите до жлездениот паренхим за да предизвикаат инфламација (8, 154, 178). И нашите резултати укажуваат на завист помеѓу висината на МЖ во однос на застапеноста на СМ, кравите со МЖ под самиот скочен зглоб имаат значителен повисок БСК, но не се утврди статистичка значајност помеѓу кравите со МЖ над и под скочниот зглоб со одреден причинител или склоност на некоја четвртина кон некој причинител. Овој податок потврдува дека МЖ кои се поблиску до подот се повеќе склони кон СМ, а секако БСК е одговор на ИМИ, додека од секоја ИМИ не мора да биде изолиран причинител. Можеби неможноста да најдеме поврзаност помеѓу локацијата на четвртините со БСК и ИМИ е поради високата застапеност на контагиозни причинители во нашето истражување. Повеќето автори се согласни дека преносот на инфекцијата (*S. aureus*, *Strep. uberis* и *Strep. agalactiae*) не се случува само од крава на крава туку и постои меѓу зависност помеѓу четвртините во рамките на кравата, каде во стадото каде има поголем процент на инфицирани четвртини ризикот за не инфицираните четвртини да заболат е голем (176, 177).

Дополнително, склоноста кон СМ на задните четвртини во однос на предните е разликата во количеството на продукција на млекото, каде застапеноста на СМ се зголемува со зголемување на производството на млеко (175, 176). Slyzius E. et al. (2013) утврдиле дека задните четвртини создаваат за 16.4% повеќе млеко од предните четвртини, додека продукцијата помеѓу левите и десните четвртини не се разликувала (178). Slyzius E. et al. (2014) утврдиле 12% повеќе бактериолошки позитивни

примероци по четврт кога производството на млеко во предните четвртини беше <45%, отколку кај кравите кога тој процент беше >45. Истите автори репортираат за 3.1% помалку бактериолошки позитивни примероци по четвртина кај кравите каде разликата во приносот на млеко помеѓу четвртините е до 11% (8).

Guarin J. F. et al. (2017) иако утврдиле поголем број на бактерии на кожата од задните боски, сепак застапеноста на КМ била статистички поголема кај предните четвртини и тоа што најголем број од предизвикувачките М/О биле околинските маститис патогени. Ваквата состојба може да е и како последица на тоа што задните четвртини имаат повисок БСК кој ги прави по отпорни кон развивање на КМ. Исто така, истите автори за причини наведуваат и други ризик фактори кои се базираат во разликата на подготовката за молзење помеѓу предните и задните боски (170).

Горенаведените наоди од различните истражувања укажуваат дека при селекција на кравите неминовен е детален морфолошки преглед на МЖ во насока на пониска застапеност на СМ.

Во нашето истражување вкупно се процесуирани на MALDI-TOF MS, 529 изолати, од кој успешно се идентификувани до вид 86.58% (n = 458) и тоа 65 различни видови, додека до ниво на род се идентификувани 1.13% (n = 6) *Streptococcus spp.* и *Corynebacterium spp.*, додека 12.29% (n=65) не беа дијагностицирани. Секој изолат беше два пати идентификуван, а за точен резултат го земавме само доколку процент на споредливост со протеинскиот профил од базата беше >85%. Речиси во сите фарми кој беа дел од истражувањето имаше по некој не идентификуван причинител. Сите изолати кои се специфични како причинители на СМ беа идентификувани лесно и брзо до ниво на вид. Слично на нашето истражување и слични податоци се добиени во едно истражување во хуманата медицина на причинители од клинички случаи каде стапката на идентификација до ниво на род и вид со MALDI –TOF MS била 96.8% и 88.7% од аеробните бактерии, додека 90.5% и 78.5% од анаеробните бактерии. Не идентификуваните причинители се бактерии кој не се чести во клиничката пракса, а како причини се наведуваат дека станува збор за отсуство на пикови кој се потребни за успешна идентификација. Тие исто така укажуваат дека нема статистичка значајност во идентификувањето помеѓу грам позитивните и негативните бактерии (123). Bettina N. et al. (2019) во своето истражување вклучиле 413 изолати добиени од СМ и КМ,

каде со MALDI-TOF MS успешно идентификувале 93.5% (n = 386) до вид и 6.5% (27) род, каде се детектирани 24 родови и 61 вид (124) .

Последните години CoNS стануваат најчестите патогени причинители на CM кај кравите и претставуваат хомогена група која со конвенционалните тестови отежнато е да се направи прецизна дијагноза на видовите (180). Поради тоа се повеќе се испитува примената на MALDI-TOF MS како алатка во дијагностицирањето на CoNS. Во истражувањето на Tiago T. et al. (2014) каде се изолирани само CoNS од CM со MALDI-TOF MS прецизно биле дијагностицирани 95.37% (103/ 108) изолати, каде потврдата на изолатите е потврдена со PCR-RFLP (180). Дополнително во истражувањето на Banach T. et al. (2016) успешноста на идентификацијата на CoNS била 81.8% (181). Слично истражување е направено и од Yasser S. M. et al. (2018) каде 511 изолати биле испитувани на MALDI-TOF MS каде успешно до вид биле идентификувани 78% (n = 399). Од 399 идентификувани изолати, 373 припаѓале на CoNS каде 115 изолати потекнувале од четвртини со CM и биле успешно идентификувани 91% (n = 105), додека останатите изолати биле земени од врвот на боските и успешноста на нивната идентификација била 68% (268 / 396) (182). Што укажува дека MALDI-TOF MS има висока осетливост во идентификувањето на бактериите кои потекнуваат од млекото, додека бактериите кои се од околината (зафатени на самите боцки) претставуваат и дел од нормалната микрофлора на кожата каде не биле воопшто вклучени во базата на податоци на самиот производител на MALDI-TOF MS или пак дополнително објаснување е дека ваквите околински причинители може да развијат дополнителен слој или капсула како дополнителен протеински материјал како средство за заштита од неповолните околински услови. Во истражувањето од хуманата медицина од Abdessalam Ch. et al. (2010) каде 720 изолати од различни извори (урина, измет, респираторен тракт, репродуктивен тракт, крв и др) правена е компарација помеѓу двата главни произведувачи на MALDI-TOF MS Bruker и Shimadzu, каде процентот на идентификација бил 94.4% (680) и 88.8% (639), а за точни вредности се земала само доколку процентот на споредливост на протеинскиот профил бил >70% (122). Дополнително Bettina N et al. (2018) навеле дека со примена на конвенционалните методи дијагностиката на *small colony variants* (SCV) *Staphylococcus aureus* може да бидат погрешно идентификувани поради нивниот бавен раст, > 10 пати помали од обичните *Staphylococcus aureus* како и изразуваат задоцнета реакција на коагулаза и помала хемолиза, каде MALDI-TOF MS може успешно да ги

идентификува, знаејќи дека ваквиот облик на *staphylococcus aureus* предизвикува хронични и рекурентни инфекции баш поради состојбата на SCV која му овозможува интрацелуларен опстанок (124).

Во севкупните податоци се забележува дека процентот на не идентификувани бактерии не поминува >22% како во хуманата така и во ветеринарната медицина (182). Во нашето истражување добиениот процент на не идентификувани изолати беше 12 % и е речиси во согласност со другите истражувања кои ја користеле оваа дијагностичка алатка каде некаде тој процент бил поголем или помал. Пред се, како прелиминарна причина може да е тоа што софтверот на податоци во SARAMIS базата која ја користевме ние пред се беше наменета за хумани изолати и не беше обновена со нови бактериски профили кои се причинители кај животните или округот на нивната локална микрофлора карактеристична за тукашните најчести причинители. Дополнително и други автори наведуваат и многу дополнителни фактори кој можат да влијаат врз идентификацијата на изолатите со примена на MALDI-TOF MS, всушност и тоа се неговите негативни страни. Тој не може да идентификува полимикробни примероци, културата треба да е чиста од единечен специес каде мешаната култура MALDI-TOF MS не може да ја идентификува бидејќи ќе добие различни спектри (124, 180). Оваа постапка прелиминарно зависи од квалификуван персонал, а сепак се одразува како негативност на самиот апарат. Премногу голем инокулум кој се нанесува на самата плоча може да влијае на идентификацијата т.е. матриксот нема соодветно и во доволна мера да го кристализира/дехидрира па ќе се создадат специфични спектри кој не можат да бидат соодветно толкувани (181). Исто така, фазата на раст, условите на културата како и селективните медиуми се наведени како причини кој може да влијае врз постапката на диференцирање (181). Првично претставува скап апарат (180), но трошокот е споредлив со оној на вообичаена лабораториска опрема за бактериологија (122).

Добиените наши резултати како и споредбата со податоците од литературата за примената на MALDI-TOFMS во дијагностицирањето на причинителите на СМ укажуваат дека тој претставува идеална алатка за прелиминарна идентификација особено во тријажните истражувања на фармите каде би се собрале голем број на причинители и потребна е нивна брза, соодветна и евтина идентификација. Останатиот мал процент кој не е дијагностициран ако е статистички значаен би се идентификувал со посовремените дијагностички алатки, пред се молекуларните алатки

кои се неминовен златен стандард во дијагностицирањето. Од добиените причинители можат нивните профили да се вметнат во базата на MALDI-TOF MS кој може постојано да се проширува и дополнува со дополнителни видови, што е голема предност

7. ЗАКЛУЧОЦИ

Врз основа на добиените резултати од спроведеното истражување, може да се заклучи дека :

- Во истражувањето утврдена е висока застапеноста на СМ, каде на ниво на крава беше 74%, додека на ниво на четвртина беше 43%.
- Од бактериолошки позитивните четвртини највисок процент на изолирани причинители имавме од четвртини со БСК <200.000кл/мл или 22%, 19% од причинителите беа изолирани од четвртини со БСК од 200.000 до 400.000кл/мл, и 10% во четвртините со БСК од 400.000 до 600.000кл/мл. Вака добиените резултати укажуваат дека само лимитот од 200.000кл/мл не е идеална дијагностички алатка која со сигурност може да ги разликува инфицираните од не инфицираните четвртини
- Утврдена е присутност на лактококите во млечните четвртини при трикратното земање на млеко како и силен имунолошкиот одговор преставен преку БСК. Просекот на БСК за *Lactococcus lactis* и *Lactococcus garvieae* изнесуваше 1.482.085 и 469.111 кл/мл. Ваквата состојба укажува дека лактококите дефинитивно се етиолошки агенс на СМ и треба да се користат подобрени методи за нивно успешно дијагностицирање.
- Поради широките опсези на БСК од четвртините каде е изолиран ист причинител, како и БСК од четвртините каде е изолирани друг причинител утврдени се препокривања на БСК што укажува дека само со БСК по четвртина не можеме да го одредиме самиот причинител.
- При споредба на резултатите само од првото земање со финалната класификација (компарација на трикратното тестирање и различниот CFU) констатиравме дека 95% од микробиолошки негативните четвртини при првото мострирање и финално биле прогласени како негативни. Четвртините кои при првото мострирање дале микробиолошки наод cfu >50/0.01мл (C), 74% од нив и

финално биле класифицирани како позитивни. Добиените податоци од микробиолошките анализи укажуваат дека има изразено висок процент на усогласеност во наодите при единечно земање примерок и финалниот резултат од трикратното тестирање.

- Неминовна е интегрираност на микробиолошкиот преглед и БСК во програмите за контрола на СМ. Према цитираната литература и добиените наши резултати, во ерадикацијата на СМ на нашите фарми, привично се препорачува користење на БСК, при што примероците млеко со <50.000 кл/мл би укажувале на негативна четвртина, додека за останатиот дел од четвртините ќе биде потребно дополнително бактериолошко испитување. Четвртините кои при бактериолошкото тестирање имаат cfu $> 50/0.01\text{ml}$ би се прогласиле за позитивни, а за останатите четвртини да се препорача континуирано следење на БСК.
- Хигиенската оценка на МЖ помеѓу различните системи на одгледување е независна од системот, а хигиенските оценки најверојатно се должат на разликите во секојдневните практики во подготовката на МЖ за молзење, а не од системите на одгледување. Висината на хигиенските оценки на останатите делови од телото, вклучително и бутот, е под влијание менаџментот на фармата, конзистенцијата на изметот и зачестеноста на чистење на фармите.
- При врзан систем на одгледување нашите хигиенски резултати укажуваат на највисока оценка на бутот, па нозете и млечното огледало, додека за пуштениот систем на одгледување засегнат е само дисталниот дел од нозете па потоа МЖ, која најверојатно страда како последица од високата хигиенска оценка за нозете.
- За врзаниот систем најголемо значење ќе има зачестеноста на чистењето на лежиштето и користење простирка, бидејќи со ваквиот систем на одгледување кравата во истото место дефецира, лежи и се молзе, немајќи друг избор. Ваквите резултати добиени од нашите фарми, укажуваат кон што поскоро трансформирање на фармите од врзан систем кон фарми со пуштен систем со

цел максимално искористување на придобивките од пуштениот систем на одгледување како и потенцијалот кој го поседува самата крва.

- Прикажаните истражувања донекаде даваат слични и очекувани податоци со оглед на тоа што МЖ и нозете се делови од телото кои се постојано изложени на ѓубриво и се во корелација /зависност со СМ. Сепак, нашето истражување не ја утврди таа поврзаност, спротивно, се констатира позитивна статистичка значајност помеѓу чистота на млечното огледало и застапеноста на СМ.
- На ниту на една фарма не најдовме статистичка значајност дека има изразено отстапување во застапеноста на хиперкератозата, што укажува дека системот на молзење не е примарен фактор во појавата на хиперкератозата
- Утврдено е значајно повисок БСК кај боските со R (3) и VR (4) степен наспроти оние со N (1) и S (2) степен на хиперкератоза. Исто така се утврди зависност на степенот на хиперкератозата со застапеноста на СМ т.е колку е поголем степенот на хиперкероза толку таа боска е повеќе склона кон инфекција.
- Сите четвртини од МЖ се подеднакво се склони кон инфекција, каде не се забележаа статистички значителни отстапки во ниту една четвртина во однос на четирите класификации (B, M, V и N) поврзани со БСК и ИМИ, како и соодносот предни во однос задни четвртини.
- Добиените наши резултати за примената на MALDI-TOF MS во дијагностицирањето на причинителите на СМ укажуваат дека тој претставува идеална алатка за прелиминарна идентификација особено во тријажните истражувања на фармите каде би се собрале голем број на причинители и потребна е нивна брза, соодветна и евтина идентификација

8. СПИСОК НА КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

1. Георги Мицковски и Љупчо Мицков, Скопје (2010), Заболувања на млечната жлезда
2. Stanko Boboš, Branka Vidić, Novi Sad (2005) Mlečna Žlezda Preživara Morfologija-patologija-terapija,
3. Nickerson S. C. and Akers RM (2011), Mammary Gland/anatomy Encyclopedia of Dairy Sciences, Second Edition Vol.3, pp 328-337. San Diego
4. Bath, D., Dickenson F., Tucker H., and Appelman R., (1978) Dairy Cattle: Principles Practices, Profits Lea & Febiger, Philadelphia.
5. Roger Blowey and Peter Edmondson, (2010), Mastitis control in dairy herds, 2nd Edition, CAB International.
6. Goran Bačić Zagreb (2009), Dijagnostika i liječenje mastitisa u goveda,
7. Tancin, V., M. Uhrincat, L. Macuhova and R.M. Bruckmaier, Czech J. (2007) Effect of pre-stimulation on milk flow pattern distribution of milk constituents at a quarter level. Anim Sci., 52: 117-121
8. E.Slyzius, V.Juozaityte, A. Juozaitis, V. Zilaitis, B. Slyziene and E. Cereskiene, (2014), Udder Quarters Morphological and Milking traits Risk Factors Influencing Productivity and Subclinical mastitis in Dairy Cows, Bulgarian Journal of Agricultural Science, 20 (No 6) , 1502-1507
9. Дом А. Семјуелсон (2007) Учебник по Ветеринарна Хистологија, Флорида
10. C.O. Paulrad (2005) Basic Concepts of the bovine teat canal, Veterinary research Communications, 29 (3), 215-245
11. Pascal Rainard, Céline Riollot (2006) Innate immunity of the bovine mammary gland, Vet. Res 37, 369-4000

12. Mohamed Ezzat Alnakip, Marcos Quintela-Baluja, Karola Böhme, Inmaculada Fernández-No, Sonia Caamano-Antelo, Pilar Calo-Mata, and Jorge Barros-Velázquez, (2014) The Immunology of mammary gland of dairy ruminants between healthy and inflammatory conditions, *Jurnal of Veterinary Medicine* vol.
13. A. Zecconi, J. Hamanno, V. Bronzo, P. Moroni, G. Giovannini, and R. Piccinini, (2002) Relationship between teat tissue immune defences and intramammary infections in *Biology of the Mammary Gland* pp. 287-293, Springer, New York, NY, USA.
14. M. Lazarevič, (2003) *Imunologija Mlečna Žlezda*, *Vet. glasnik* 57 (5 - 6) 269 - 277 Beograd
15. Ivana Davidov, Stanko Baboš, Miodrag Radinović, Mihajlo Erdeljan, (2011) *Nalaz leukocitarnog infiltrata u cisternama mlečnih žlezda krava*, *Letopis naučnih radova* br.1 str.98-130 Beograd
16. K.G. Hibbitt, C.B. Cole and B. Reiter (1969) *Antimicrobial Isolated from the Teat Canal of the Cow*
17. A. Sharif and G. Muhammad, Somatic cell count as an indicator of udder health status under modern dairy production: A Review, *Pakistan Vet. J.* 28(4): 194-200 (2008)
18. I.R. Dohoo and A.H. Meek, (1982), Somatic cell counts in bovine milk, *Can. vet. J.* 23 119-125
19. Neijenhuis, Francesca. (2004). *Teat condition in dairy cows*. Thesis (PhD). Utrecht University, Utrecht.
20. P. Tongel and J. Brouček, (2010), Influence of hygienic condition on prevalence of mastitis and lameness in dairy cows *Slovak J. Anim.* 43, 95-22 (2)
21. Ylva Persson, Ann-Kristin J Nyman and Ulrika Gronlund-Andersson (2011), Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden, *Acta Veterinaria Scandinavica* 53:36

22. Ahmed Abdel-Rady and Mohammed Sayed (2009), Epidemiological studies on subclinical mastitis in dairy cows in Assiut Governorate Veterinary world, vol.2 373-380 No.10
23. N. Sharma, N.K. Singh, and M.S. Bhadwal Asian-Aust. (2011), Relationship of Somatic Cell Count and Mastitis: An Overview, J.Anim. Sci Vol.24, No.3: 429-438
24. G Andres Contreras and Juan Miguel Rodriquez (2011), Mastitis: Comparative Etiology and Epidemiology J Mammary Gland Biol Neoplasia 16:339-356
25. S. Hristov, B. Stankovic, R. Relic, (2005) Klinichki i subklinichki mastitis u krava Biotechnology in Animal Husbandry 21 (1-2), p 29-39,
26. R Giannechini, C Concha, R Rivero, I Delicci and J Moreno Lopez (2002), Occurrence of clinical and subclinical mastitis id dairy herds in the west littoral region in Uruguay, Acta vet Scand 43 (4): 221–230
27. E.D. Karimuribo, J.L. Fitzpatrick, E.S. Swai, C. Bell, M.J. Bryant, N.H. Ogden, D.M. Kambarage, N.P. (2008), Prevalence of subclinical mastitis and associated risk factors in smallholder dairy cows in Tanzania French Veterinary record 163 16-21,
28. D. Sylejmani, N. Ramadani, A. Robaj and A. Hamidi (2015) Prevalence and antimicrobial susceptibility of bacterial isolates from subclinical mastitis in dairy farms in Kosovo Bulgarian journal of veterinary medicine, ISSN 1311-1477, DOI 10.15547
29. Sanotheran, N., Pagthinatham, M. and Nafees (2016) Prevalence of bovine subclinical mastitis and its association with bacteria and risk factors in milking cows of Batticaloa district in Sri Lanka International journal of scientific research and innovative technology Vol.3 No.6
30. Marie-Anne Botrel, Marisa Haenni, Eric Morignat, Philippe Sulpice, Jean-Yves Madec and Didier Calavas (2010), Distribution and antimicrobial resistance of clinical and subclinical mastitis pathogens in dairy cows in Rhone-Alpes, France Foodborne pathogens and disease Vol. 7 no.5

31. Naglich Hajsig, Madich Pinter, (2005) Veterinarska Mikrobiologija, Specijalna bakteriologija i mikologija, Zagreb
32. Dwight C. Hirsh, N. James MacLachlan, Richard L. Walcer (2004) Veterinary microbiology
33. Zecconi.A (2010), Staphylococcus aureus mastitis: what we need to know to control them- review, Iseral journal of veterinary medicine Volume 65 (3)
34. P. Rainard, G. Foucras, J.R. Fitzgerald, J.L. Watts, G. Koop, J.R. Middleton, Knowledge gaps and research priorities in Staphylococcus aureus mastitis control, Transbound Emerg Dis. 65 (suppl. 1): 149-165 (2018)
35. Miroslav Benić, Boris Habrun, Gordan Kompes. (2011) Clinical and epidemiological aspects of cow mastitis caused by staphylococcus aureus and its methicillin-resistant strains, Rad hrvatske Akademije znanosti i umjetnosti. Medicinske znanosti No. 511= 37,
36. N. Rajich, N. Lazarevich, B. Krstich, M. Podunavac, (2007) Nalaz Staphylococcus aureus i njegov značaj za kvalitet i zdravstvenu ispravnost mleka, Zbornik nauchnih radova, Vol. 13, br. 3-4, 65-71.
37. S. Hristov, Renata Reljich (2004) Sprechuvanje pojave I suzbivanje stafilokoknog mastitisa krava, Zbornik nauchnih radova, Vol. 10, br. 2, 31-38.
38. C.S. Petersson-Wolfe, I.K. Mullarky, G.M. Jones (2010) Staphylococcus aureus mastitis: cause, detection and control, Verginia cooperative extension, publication 404-229
39. O. Kerro Dego, J. E van Dijk and H. Nederbragt, (2002) Factors involved in the early pathogenesis of bovine staphylococcus aureus mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion- A review, Veterinary quarterly, 24 (4): 181-198

40. Danijela Kirovski, Horea Shamanc, Ivan Vujanac, Radisha Popovic, Zeljko Sladojevic Metabolicke bolesti i zdravlje mlečne žlezde, (не објавен труд)

41. Ana Rita Costa, Deivid W. F. Batistao, Rosineide M. Ribas, Ana Margarida Sousa, M. Olivia Pereira and Claudia M. Botelho, (2013) Staphylococcus aureus virulence factors and disease, Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education

42. Judy Higgins, Anthony Loughman, Kok P.M. Van Kessel, Jos A. G. Van Strijp, Timothy J. Foster (2006) Clumping factor, A of Staphylococcus aureus inhibits phagocytosis by human polymorphonuclear leucocytes, FEMS Microbiology Letters, Volume 258, Issue Pages 290–296

43. Sutra L and Poutrel B. (1994) Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to S. aureus, Journal of Medical Microbiology 40: 79-89

44. Fernanda Gomes, Maria Jose Saavedra and Mariana Henriques, (2016) Bovine mastitis disease / pathogenicity: evidence of the potential role of microbial biofilms, Pathogens and Disease, 74, ftw 006

45. H.W. Berkema, Y. H. Schukken and R. N Zadoks (2006) Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine staphylococcus aureus mastitis, J. Dairy Sci. 89:1877-1895

46. Volker Kromker, Friederike Reinecke, Jan-Hendrik Paduch and Nils Grabowski, (2014) Bovine Streptococcus uberis intramammary infections and mastitis, Clin Microbial vol.3 Issue

47. Victoria Lynn Douglas (1999) Mastitis in New Zealand dairy herds: 1. Management, diagnosis, and treatment of subclinical mastitis, 2 Phenotypic and genotypic characterization of streptococcus uberis isolates,

48. James A. Leigh, (1999) Streptococcus uberis : A permanent barrier to the control of bovine mastitis? The veterinary 157, 225-238.

49. R. N Zadoks, H.G. Allore, H.W. Berkema, O. C. Sampimon, Y.T Grohn and Y.H. Schukken, (2001) Analysis of an outbreak of streptococcus uberis mastitis, J.Dairy Sci. 84:590-599
50. Christina S. Peterson –Wolfe and John Currin (2012), Streptococcus uberis: A practical summary for controlling mastitis, Virginia cooperative extension, publication DASC-8P
51. Oliver S. P, Almeida R. A, Calvinho L. F, (1998) Virulence factors of streptococcus uberis isolated from cows with mastitis, Zentralbl Veterinarmed B 45: 461-471
52. Satu Pyorala, Suvi Taponen , (2009), Coagulase-negative staphylococci—Emerging mastitis pathogens, Veterinary Microbiology 134, 3–8
53. P. Krishnamoorthy, M.L. Satyanarayana and B.R. Shome Res. (2016) Review Article Coagulase Negative Staphylococcal Species Mastitis: An Overview J. Vet. Sci., 9 (1): 1-10,
54. S. De Vliegher , L. K. Fox, S. Piepers , S. McDougall, and H. W. Barkema J. (2012) Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control, Dairy Sci. 95 :1025–1040
55. W. Vanderhaeghen, S. Piepers, F. Leroy, E. Van Coillie , F. Haesebrouck, and S. De Vliegher, (2014), *Invited review*: Effect, persistence, and virulence of coagulase-negative *Staphylococcus* species associated with ruminant udder health, J. Dairy Sci. 97 :5275–5293
56. Britt-Marie Thorberg (2008) Coagulase-negative Staphylococci in Bovine Sub-clinical Mastitis, Swedish University of Agricultural Sciences Report No.2, Uppsala
57. Suvi Taponen, (2008) Bovine mastitis caused by coagulase-negative staphylococci, Academic Dissertation, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Finland.
58. T. Tomazi, J. L. Gonçalves, J. R. Barreiro, M. A. Arcari, and M. V. dos Santos Bovine subclinical intramammary infection caused by coagulase-negative staphylococci

increases somatic cell count but has no effect on milk yield or composition, *Journal of Dairy Science* Vol. 98: 3071–3078 No. 5, (2015)

59. Piepers, S., Peeters, G. Opsomer, H.W. Barkema, K. Frankena and S. De Vliegher (2011), Pathogen group specific risk factors at herd, heifer and quarter levels for intramammary infections in early lactating dairy heifers, *Prev. Vet. Med.* 99:91–101.

60. Leitner, G., O. Krifucks, A. Glickman, A. Younis and A. Saran, (2003) *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis: Virulence, antibody production and protection from challenge in a mouse model, *FEMS Immunol.Med. Microbiol* 35:99-106

61. Glei A.Carvalho-Castro, Juliana R. Silva, Luciano V. Paiva, Dircéia A.C.Custódio, Rafael O. Moreira, Glaucia F. Mian, Ingrid A. Prado, Antônio Chalfun-Junior, Geraldo M. Costa (2017) Molecular epidemiology of *streptococcus agalactiae* isolated from mastitis in Brazilian dairy herds, *Brazilian journal of microbiology* 48 551-559

62. Maoda Pang, Lichang Sun, Tao He, Hongdu Bao, Lili Zhang, Yan Zhou, Hui Zhang, Ruicheng Wei, Yongjie Liu and Ran Wang (2017) Molecular and virulence characterization of highly prevalent *streptococcus agalactiae* circulated in bovine dairy herd, *Veterinary research* 48:65

63. Kristin Merl, Amir Abdulmawjood, Christoph Lämmle, Michael Zschöck (2003) Determination of epidemiological relationships of *streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis, *FEMS microbiology letters* 226, 87-92

64. Biniam Tsegaye Lakew, Taresa Fayera, Yimer Muktar Ali, (2019) Risk factors for bovine mastitis with the isolation and identification of *streptococcus agalactiae* from farms in and around Haramaya district, eastern Ethiopia *Tropical animal health and production* 51:1507-1513

65. A.B.A. Corrêr, M.A. Américo, I.C.M. Oliveira, L.G. Silva, M.C. de Mattos, A.M.M. Ferreira, J.N.S.S. Couceiro, S.E.L. Fracalanza, (2010), Virulence characteristics of genetically related isolates of group B streptococci from bovines and humans, *Veterinary Microbiology* 143, 429-433

66. Sarah Shabayek and Barbara Spellerberg, (2018), Group B streptococcal colonization, molecular characteristics, and epidemiology, *Frontiers in microbiology* 9:437, (2018)
67. Rafael S. Duarte, Otávio P. Miranda, Bruna C. Bellei, Maria Aparecida V.P. Brito and Lucia M. Teixeira, (2004) Phenotypic and molecular characteristics of streptococcus agalactiae isolates recovered from milk of dairy cows in Brazil, *Journal of clinical microbiology* vol.42, No.9 p.4214-4222
68. Keefe G. P, (1997) Streptococcus agalactiae mastitis: a review, *Can Vet J.* 38(7): 429–437.
69. Greg Keefe, (2012) Update on control of staphylococcus aureus and streptococcus agalactiae for management of mastitis, *Vet Clin Food Anim* 28, 203-216
70. Julian Reyes Velez, (2016), Streptococcus agalactiae subclinical mastitis epidemiology and control in columbian dairy herds,
71. Marshal M. Mweu, Soøren S. Nielsen, Tariq Halasa, Nils Toft, (2012) Annual incidence, prevalence and transmission characteristics of streptococcus agalactiae in Danish dairy herds, *Preventive veterinary medicine* 106, 244-250
72. Clarisse Maximo Arpini, Patricia Gomes Cardoso, Isadora Marques Paiva, Dirceia Aparecida da Costa Custódio and Geraldo Márcio da Costa, (2016) Virulence genes of the streptococcus agalactiae associated with bovine mastitis in Minas Gerais livestock herds, Brazil, *Appli micro-open access*, 2:3,
73. Jørgensen H. J, Nordstoga A. B, Sviland S, Zadoks R. N, Sølverød L, Kvitle B., Mørk T. (2016) Streptococcus agalactiae in the environment of bovine dairy herds – rewriting the textbooks, *Veterinary microbiology* 184, 64-72
74. S. Bojković Kovačević, N. Lazarević, (2009), Koralacija između CMT testa, subkliničkih mastitisa i broja somatskih ćelija, *Zbornik naučnih radova*, Vol.15 br.3-4

75. Zrinka Čačić, Samir Kalit, Neven Antunac, Mato Čačić (2003), Somatske stanice i čembenice koje utječu na njihov broj u mlijeku, Mljekarstvo 56 (1) 23-36,
76. Tariq Ahmad Malik, Madhu Mohini, Shahid Hassan Mir, Bilal Ahmad Gananie Digvijay Singh, Tarun Kumar varun, Sanjay Howal, Shubham Thakur (2018), Somatic Cell In Relation to udder Health and milk Quality- A Review, Journal of Animal Health and Production Volume 6, Issue 1, Page 18 March
77. S. Hristov, R. Relić, B. Stanković, D. Vuković, (2006), Uticaj pojedinih faktora na broj somatskih ćelija u mleku krava, vol.12 br.3-4 47-57
78. Resul Koçyigit, Oktay Yilmaz, Erhan Ozenç, Mehmet Uçar, (2016) Effect of some risk factors on subclinical mastitis on dairy cows, Kocatepe Vet J 9 (3): 185-193
79. Hillerton. J. E, (1999) Redefining mastitis based on somatic cell count, Bull.int Dairy Fed No.345, pp.4-6,
80. Belgacem Djabri, Nathalie Bareille, François Beaudeau, Henri Seegers, (2002), Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta-analysis, Vet. Res. 33 335–357
81. Буневски Ѓ (1996)
Влијание на соматските клетки врз хемискиот состав на кравјото млеко, докторска дисертација, Скопје
82. R.J. Eberhart, L.J. Hutcidnson and S.B. Spencer, (1982), Relationships of bulk tank somatic cell counts to prevalence of intramammary infection and to indices of herd production, Jornal of Food Protection, Vol.45, No.12, Pages 1125-1128
83. National Mastitis Council (2001) Guidelines on normal and abnormal raw milk based on somatic cell counts and signs of clinical mastitis

84. Andrezza M. Fernandes, Carlos A.F. Oliveira, Cesar G. Lima, (2007), Effects of somatic cell counts in milk on physical and chemical characteristics of yoghurt, *International Dairy Journal* 17, 111–115
85. A.M. Fernandes, C.A.F. Oliveira, P. Tavoraro, (2004) Relationship between somatic cell counts and composition of milk from individual Holstein cows, *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.71, n.2, p.163-166,
86. Roberto Ramos Garcia, Vinicius Bufon Maion, Kelly Molin de Almeida, Elsa Helena Walter de Santana, Marcela Rezende Costa, Rafael Fagnani, Agostinho Ludovico (2015), Relationship between somatic cell counts and milk production and composition in Jersey cows, *Rev. Salud Anim.* Vol. 37 No. 3: 137-142
87. L. Forsback, H. Lindmark-Mansson, A. Andren, M. Akerstedt and K. Svennersten-Sjaunja (2009) Udder quarter milk composition at different levels of somatic cell count in cow composite milk, *Animal*, 3:5, pp 710–717
88. Gonçalves J. L, Kamphuis C. Martins C.M.M.R, Barreiro J. R, Tomazi T, Gameiro A.H (2011), Bovine subclinical mastitis reduces milk yield and economic return, *Livestock Science* 210 25-32
89. Berglund I, Pettersson G, Ostensson K and Svennersten-Sjaunja K, (2007), Quarter Milking for Improved Detection of Increased SCC, *Reprod Dom Anim* 42, 427-432
90. Klei. L, Yun.J, Sapru. A, Lynch. J, Barbano. D, Sears. P, Galton. D, (1998), Effects of Milk Somatic cell Count on Cottage Cheese yield and Quality *J.Dairy Sci*, v.81, p. 1205-1213,
91. Cinar M, Serbester U, Ceyhan A, Gorgulu M (2015), Effect of somatic cell count on milk yield and composition of first and second lactation dairy cows, *Ital. J. Anim. Sci* 14(1): 3646
92. Bansal, B.K., Hamann, J., Grabowski, N.T., Singh, K.B (2005), Variation in the composition of selected milk fraction samples from healthy and mastitic quarters, and its significance for mastitis diagnosis, *J. Dairy Res.* 72, 144–152

93. Dror Bezman, Liubov Lemberskiy-Kuzin, Gil Katz, Uzi Merin and Gabriel Leitner (2015) Influence of intramammary infection of a single gland in dairy cows on the cow's milk quality, *Journal of Dairy Research* 82 304–311
94. M. Zdanowicz, J.A. Shelford, C.B. Tucker, D.M. Weary and M. A. G von Keyserlingk (2004) Bacterial populations on teat ends of dairy cows housed in free stalls and bedded with either sand or sawdust, *J.Dairy Sci.* 87: 1694-1701
95. A.C. Sant Anna and M.J.R. Paranhos da Costa, (2011) The relationship between dairy cow hygiene and somatic cell count in milk, *J.Dairy Sci.*94: 3835-3844
96. D.A. Schreiner and P.L. Ruegg (2003) Relationship between udder and leg hygiene scores and subclinical mastitis, *J. Dairy Sci.* 86: 3460-3465
97. Marcela de Pinho Manzi, Diego Borin Nóbrega, Patrícia Yoshida Faccioli, Marcella Zampolli Troncarelli, Benedito Donizete Menozzi, Hélio Langoni (2012) Relationship between teat-end condition, udder cleanliness and bovine subclinical mastitis, *Research in Veterinary Science* 93 430–434
98. Anna Sandrucci, Luciana Bava, Maddalena Zucali, Alberto Tamburini R.Bras. (2014) Management factors and cow traits influencing milk somatic cell counts and teat hyperkeratosis during different seasons, *Zootec.*, 43(9): 505-511
99. F.Neijenhuis, H.W. Barkema, H. Hogeveen and J.P.T.M. Noordhuizen (2001) Relationship between teat-end callosity and occurrence of clinical mastitis, *J. Dairy Sci.* 84: 2664:2672
100. F. Neijenhuis, H. W. Barkema, H. Hogeveen, and J.P.T.M. Noordhuizen (2000) Classification and Longitudinal Examination of Callused Teat Ends in Dairy Cows, *J Dairy Sci* 83:2795–2804
101. Vangelis Economou and Panagiota Gousia, Dovepress,(2015), Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria, *Infection and Drug Resistance* 49-61, 8

102. Anthony A. Adegoke, Anthony I. Okoh, (2014) Species diversity and antibiotic resistance properties of Staphylococcus of farm animal origin in Nkonkobe Municipality, South Africa, *Folia Microbiol* 59:133-140
103. Q. A. McKeller, (1998) Antimicrobial resistance: a veterinary perspective, *BMJ*. 317 (7159):610-611
104. Ketrin Cristina da Silva, Terezinha Knöbl, Andrea Micke Moreno, (2013) Antimicrobial resistance in veterinary medicine: mechanisms and bacterial agents with the greatest impact on human health, *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, v, 50, n. 3, p 171-183
105. Boris Habrun, Gordan Kompes, Tomislav Kiš, Ivana Lohman Janković (2019) Antimikrobna rezistencija u veterinarskoj medicini: nastanak i značaj, , Hrvatski veterinaren portal
106. Meseko Clement, Makanju Olabisi, Ehizibolo David and Miraina Issa, (2019) Veterinary pharmaceuticals and antimicrobial resistance in developing countries, *IntechOpen* Submitted: August 23rd 2018
107. Dalibor Todorović, DVM, (2018) Karakterizacija mehanizama rezistencije na antibiotike i molekularna tipizacija izoleta *Escherichia coli* poreklom od goveda i svinja, Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, Beograd,
108. Katie Clifford, Darash Desai, Clarissa Prazeres da Costa, Hannelore Meyer, Katharina Klohe, Andrea S Winkler, Tanvir Rahman, Taohidul Islam and Muhammad H Zaman, (2018) Antimicrobial resistance in livestock and poor-quality veterinary medicines, *Bull World Organ* 96 (9); 662-664, 1.
109. Двајт Ц. Хирш, Н. Џејмс Меклаклен, Ричард Л. Вокер (2004) Ветеринарна Микробиологија,
110. Dragana Unić-Stojanović, Ivan Palibrk, Nebojša Lađević, Dejan Marković, Branislava Stefanović, Nevena Kolezić,

(2015) Značaj bakterijske rezistencije i savremene terapijske opcije za rešenje ovog problema, Bakterijska rezistencija I savremene terapijske opcije 615.33.015.8

111. Kasravi, R; Bolourchi, M; Farzaneh, N; Seifi, H.A; Barin, A; Hovareshti, P. and Gharagozlou, F. (2010), Relationship between in vitro antimicrobial sensitivity of bovine subclinical mastitis isolates and treatment outcome in lactating dairy cows, Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University, Vol. 11, No. 3, Ser. No. 32,

112. George Cosmin NADĂȘ, Nicodim Fit, Cosmina Bouari, Flore Chirila, Sorin RĂPUNTEAN, Vasile RUS. Bulletin UASVM (2014), The susceptibility to antibiotics of some bacterial strains isolated from cow milk with mastitis, Veterinary Medicine 71(2)

113. Nevijo Zdolec, Vesna Dobranić, Ivan Butković, Ana Koturić, Ivana Filipović, and Vinco Medvid (2016), Antimicrobial susceptibility of milk bacteria from healthy and drug-treated cow udder, Veterinarski arhiv 86 (2), 163-172,

114. B.-A. Tenhagen, G. Köster, J. Wallmann and W. Heuwieser (2006), Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany, J. Dairy Sci. 89:2542–2551,

115. Marie-Anne Botrel, Marisa Haenni, Eric Morignat, Philippe Sulpice, Jean-Yves Madec and Didier Calavas, (2010) Distribution and antimicrobial resistance of clinical and subclinical mastitis pathogens in dairy cows in Rhône-Alpes, France, Foodborne pathogens and disease, Volume 7, Number 5,

116. Procedures for Collecting Milk Samples, National Mastitis Council (2004),

117. R Giannechini, C Concha, R Rivero, I Delucci, and J Moreno López, Occurrence of Clinical and Sub-Clinical Mastitis in Dairy Herds in the West Littoral Region in Uruguay, Acta Vet Scand. 2002; 43(4): 221–230.

118. Interpreting Bacteriological Culture Results to Diagnose Bovine Intramammary Infections National Mastitis Council (2012)

119. Marcela de Pinho Manzi, Diego Borin Nóbrega, Patrícia Yoshida Faccioli, Marcella Zampolli Troncarelli, Benedito Donizete Menozzi, Hélio Langoni (2012),

Relationship between teat-end condition, udder cleanliness and bovine subclinical mastitis, *Res Vet Sci* (1):430-4

120. Anna Sandrucci, Luciana Bava, Maddalena Zucali, Alberto Tamburini (2014), Management factors and cow traits influencing milk somatic cell counts and teat hyperkeratosis during different seasons, *R. Bras. Zootec.*, 43(9): 505-511,

121. Neelja Singhal, Manish Kumar, Pawan K. Kanaujia and Jugsharan S. Viridi (2015), MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis, *Front. Microbial* 6:791

122. Abdesslam Cherkaoui, Jonatham Hibbs, Stéphane Emonet, Manuela Tangomo, Myriam Girard, Patrice Francois, and Jacques Schrenzel (2010), Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level, *Journal of clinical microbiology* p. 1169-1175

123. Mao-Cheng Ge, An-Jing Kuo, Kuei-Lan Liu, Ying-Hao Wen, Ju-Hsin Chia, Pi-Yueh Chang, Ming-Hsun Lee, Tsu-Lan Wu, Shih-Cheng Chang, Jang-Jih Lu, (2017) Routine identification of microorganisms by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: Success rate, economic analysis, and clinical outcome, *J Microbiol immunol infect*:50(5), 662-668

124. Bettina Nonnemann, Ulrike Lyhs, Line Svennesen, Katja Ann Kristensen, Ilka C. Klaas and Karl Pedersen, (2019), Bovine mastitis bacteria resolved by MALDI-TOF mass spectrometry, *J. Dairy Sci.* 102:1-10

125. Emily Savage, Shubhada Chothe, Valerie Lintner, Traci Pierre, Tammy Matthews, Subhashinie Kariyawasam, Dawn Miller, Deepanker Tewari and Bhushan Jayarao (2017), Evaluation of three bacterial identification systems for species identification of bacteria isolated from bovine mastitis and bulk tank milk samples, *Foodborne pathogens and disease* Vol. 14, No. 3

126. CLSI, Performance Standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 5th ed. CLSI supplement VET01S. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020

127. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0,2020 <http://www.eucast.org>.”

128. A.L.Bhuttoa, R.D.Murraya, Z.Woldehiwet, (2012), California mastitis test scores as indicators of subclinical intra-mammary infections at the end of lactation in dairy cows, Research in Veterinary Science Vol. 92, Issue 1, Pages 13-17

129. A. Pitkälä, M. Haveri, S. Pyörälä, V. Myllys, and T. Honkanen-Buzalski, (2004), Bovine mastitis in Finland 2001 – prevalence distribution of bacteri, and antimicrobial resistance, J. Dairy Sci. 87:2433–2441

130. Otlis Sampimon, Herman W. Berkema, Inge Berends, Jan Sol and Theo Lam (2009), Prevalence of intramammary infection in Dutch herds, Journal of dairy research 76, 129-136

131. Ferguson J. D, Azzaro G, Gambina M, and Licitra G, (2007), Prevalence of Mastitis in Ragusa, Sicily, from 2000 to 2006, J. Dairy Sci. 90:5798-5813

132. M. Sztachañska, W. Barański, T. Janowski, J. Pogorzelska, S. Zduńczyk (2016), Prevalence and etiological agents of subclinical mastitis at the end of lactation in nine dairy herds in North-East Poland, Polish Journal of Veterinary Sciences Vol. 19, No. 1, 119–124

133. Busato A, Trachsel P, Schallibaum, Blum J. W, (2000), Udder health and risk factors for subclinical mastitis in organic dairy farms in **Switzerland**, Preventive Veterinary Medicine 44, 205-220

134. Edward Malinowski, Henryka Lassa, Anna Klossowska, Hanna Markiewicz, Michal Kaczmarowski and Sebastian Smulski (2006), Realationship between mastitis agents and somatic cell count in foremilk samples, Bull Vet Inst Pulawy 50, 349-352,

135. S. Taponen, E. Liski, A.-M. Heikkilä and S. Pyörälä (2017), Factors associated with intramammary infection in dairy cows caused by coagulase-negative staphylococci, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium bovis*, or *Escherichia coli*, J. Dairy Sci. 100:493–503

136. **Cervinkova D.**, Vlkova H., Borodacova I., Makovcova J., Babak V., Lorencova A., Vrtkova I., Marosevic D., Jaglic Z., (2013), Prevalence of mastitis pathogens in milk from clinically healthy cows, *Veterinarni Medicina*, 58, 2013 (11): 567–575
137. Jean Baptiste Ndahetuye, Ylva Persson, Ann-Kristin Nyman, Michael Tukei, Martin Patrick Ongol, Renée Båge (2019), Aetiology and prevalence of subclinical mastitis in dairy herds in peri-urban areas of Kigali in Rwanda, *Trop Anim Health Prod* ;51(7):2037-2044.
138. Yvonne Frey, Joan Peña Rodriguez, Andreas Thomann, Sybille Schwendener, Vincent Perreten (2013), Genetic characterization of antimicrobial resistance in coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis milk, *Journal of Dairy Science*, Volume 96, Issue 4, Pages 2247-257
139. Batcha Tamilselvam, Raúl A Almeida, John R Dunlap, Stephen P Oliver (2006) *Streptococcus uberis* internalizes and persists in bovine mammary epithelial cells, *Microb Pathog*;40(6):279-85.
140. Neave F.K., Dodd F.H., Kingwill R.G., Westgarth D.R. (1969), Control of mastitis in the dairy herd by hygiene and management. *J. Dairy Sci*; 52 (5391057): 696-707
141. Shaheen M, Tantary HA and Nabi SU (2016), A Treatise on Bovine Mastitis: Disease and Disease Economics, Etiological Basis, Risk Factors, Impact on Human Health, Therapeutic Management, Prevention and Control Strategy, *J. Advances Dairy Res.* 2016, 4:1
142. A. C. Whist, O Østerås, L Sølverød (2007), *Streptococcus dysgalactiae* isolates at calving and lactation performance within the same lactation, *J Dairy Sci*: 90 (2):766-78
143. **L. F. Calvino**, R. A. Almeida, S. P. Oliver (1998), Potential virulence factors of *Streptococcus dysgalactiae* associated with bovine mastitis, *Veterinary Microbiology* 61, 93-110
144. **L. F. Calvino** and S. P. Oliver (1997), Invasion and persistence of streptococcus dysgalactiae within bovine mammary cells *J dairy Sci* 81:678-686

145. **Carme Plumed-Ferrer**, Kaisa Uusikylä, Jenni Korhonen, Atte von Wright (2013), Characterization of *Lactococcus lactis* isolates from bovine mastitis, *Veterinary Microbiology* 167, 592-599
146. **M. X. Rodrigues**, S. F. Lima, C. H. Higgins, S. G. Caniatti-Brazaca and R. C. Bicalhho (2016), The *Lactococcus* genus as a potential emerging mastitis pathogen group: A report on an outbreak investigation, *J. Dairy Sci.* 99:1-11
147. **Madeleine Fortin**, Serge Messier, Julie Paré, Robert Higgins (2003), Identification of catalase-negative, non-beta-hemolytic, gram-positive cocci isolated from milk samples, *J Clin Microbiol*, 41 (1): 106-9
148. **Hanna Róžańska**, Aleksandra Lewtak-Piłat, Maria Kubajka, and Marcin Weiner (2019). Occurrence of Enterococci in Mastitic Cow's Milk and their Antimicrobial Resistance, *J Vet Res.* 63(1): 93–97.
149. **Aseel M. Hamzah** and Hind K. Kadim, (2018), Isolation and identification of *Enterococcus faecalis* from clinical milk samples and vaginal swab from human, *Journal of Entomology and Zoology Studies* :6 218-222,
150. **Diego Cariolato**, Christian Andrighetto, Angiolella Lombardi, (2008), Occurrence of virulence factors and antibiotic resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from dairy and human samples in North Italy, *Food control* 19, 886-892
151. **Feng Yang**, Shidong Zhang, Xiaofei Shang, Xurong Wang, Zuoting Yan, Hongsheng Li, Jianxi Li (2019), Short communication: Antimicrobial resistance and virulence genes of *Enterococcus faecalis* isolated from subclinical bovine mastitis cases in China, *J Dairy Sci*, 102(1):140-144. Enterococ 5
152. Nam. H. M., Lim S. K., Moon S. J., Kang M.H., Kim M. J., Jang C.K., Kim M. J., Kang I.M., Joo S. Y., Jung C. S., (2010), Antimicrobial resistance of enterococci isolated from mastitic bovine milk samples in Korea, *Zoonoses Public Health*;57(7-8):e59-64.

153. M. Chassagne, J. Barnouin and M. Le Guenic, (2005), Expert Assessment Study of Milking and Hygiene Practices Characterizing Very Low Somatic Cell Score Herds in France, J. Dairy Sci. 88:1909–1916
154. J. F. Guarin, M. G. Paixão, P. L. Ruegg, (2017), Association of anatomical characteristics of teats with quarter-level somatic cell count, J. Dairy Sci.
155. **Hagnesten-Nielsen. C.**, U Emanuelson, B Berglund, E Strandberg (2009), Relationship between somatic cell count and milk yield in different stages of lactation, J dairy Sci 92 (7), 3124-33
156. Агенција за храна и ветеринарство, 20120260814, Службен весник на РМ, бр. 26 од 21.2.2012 година, Правилник за посебни барања за безбедност и хигиена и начинот и постапката за вршење на службените контроли на млеко и млечните производи
157. National Mastitis Council (2005), Human health risks associated with high somatic cell count milk
158. **Ma. Y.**, C. Ryan, D. M. Barbano, D. M Galton, M. A Rudan and K. J. Boor, 2000. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk, J.Dairy Sci.,83: 264-274
159. **Fernando N. Souza**, Adriano F. Cunha, Dalila L.S.O. Rosa, Maria Aparecida V. Brito, Alessandro S. Guimarães, Letícia C. Mendonça, Guilherme N. Souza, Andrey P. Lage, Maiara G. Blagitz, Alice M.M.P. Della Libera, Marcos B. Heinemann and Mônica M.O.P. Cerqueira, (2016), Somatic cell count and mastitis pathogen detection in composite and single or duplicate quarter milk samples, Pesq. Vet. Bras. 36(9):811-818
160. **Pyörälä Satu**, (2003), Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis, Vet Res. 34 565-578
161. **I.Dohoo**, S.Andersen, R.Dingwell, K.Hand, D.Kelton, K.Leslie, Y.Schukken, S.Godden (2011), Diagnosing intramammary infections: Comparison of multiple versus single q

quarter milk samples for the identification of intramammary infections in lactating dairy cows, Journal of dairy science Pages 5515-5522

162. **S Andersen** , I R Dohoo, R Olde Riekerink, H Stryhn, Mastitis Research Workers Conference,(2010), Diagnosing intramammary infections: evaluating expert opinions on the definition of intramammary infection using conjoint analysis, J Dairy Sci ; 93 (7):2966-75

163. **Jeffrey K. Reneau**, dvm, ms, Anthony J. Seykora, phd, Bradley J. Heins, bs, Marcia I. Endres, dvm, phd, Ralph J. Farnsworth, dvm,ms, Russell F.Bey, phd Association between hygiene scores and somatic scores in dairy cattle, JAVMA, Vol 227, No. 8 (2005)

164. **K Zurbrigg**, D Kelton, N Anderson, S Millman (2005), Tie-stall design and its relationship to lameness, injury, and cleanliness on 317 Ontario dairy farms. J. Dairy Sci: 88 (9):3201-10

165. **Abdul L.Bhutto**, Richard D.Murray, Zera Woldehiwet (2010), Udder shape and teat-end lesions as potential risk factors for high somatic cell counts and intra-mammary infections in dairy cows, The veterinary journal vol. 183, pages 63-67

166. **R. Asadpour**, H. Bagherniaee, M. Houshmandzad, H. Fatehi, A. Rafat, K. Nofouzi, K.Maftouni, (2012), Relationship between teat end hyperkeratosis with intramammary infection and somatic cell counts in lactating dairy cattle, Revue Méd Vét 166, 9-10, 266-270

167. **Vida Juozaitiene**, Arunas Juozaitis, Judita Zymantiene, Vaidas Oberauskas, Albina Aniulienė, Lina Kajokienė, Ayhan Yilmaz, Aistė Simokaitienė, (2019), The effect of different levels of teat-end hyperkeratosis on mammary infrared thermograph and mastitis in dairy cows, Ankara Üniv Vet Fak Derg, 66, 21-26,

168. **Birten Emre**, Erol Alaçam, (2015), The occurrence of teat hyperkeratosis in cows and its effects on milk somatic cell counts, Türkiye Klinikleri J Vet Sci; 6 (1): 1-6

169. G. A. Mein, F. Neijenhuis, W.F. Morgan, D. J. Reinemann, J. E. Hillerton, J. R. Baines, I. Ohnstad, M. D. Rasmussen, L. Timms, J. S. Britt, R. Farnsworth, N. Cook & T.

Hemling. "Teat Club International", c/o F. Neijenhuis, Research Institute for Animal Husbandry Lelystad, The Netherlands, (2001), Evaluation of bovine teat condition in commercial dairy herds 1. Non-infectious factors, Written for the AABP-NMC International Symposium on Mastitis and Milk Quality in Vancouver, BC, Canada.

170. **J. F. Guarin**, C. Baumberger, and P. L. Ruegg, (2017), Anatomical characteristics of teats and premilking bacterial counts of teat skin swabs of primiparous cows exposed to different types of bedding, J. Dairy Sci. 100:1-9

171. **Martin F. H. Shearn** and J. Eric Hillerton, (1996), Hyperkeratosis of the teat duct orifice in the dairy cow, Journal of dairy research 63 525-532

172. **David E. Gleeson**, MSc, Villiam J. Meaney MSc, Edmond J.O"Callaghan BE, MengSc, PhD, Myles V. Rath, BAgSc, PhD (2004), Effect of teat hyperkeratosis on somatic cell counts of dairy cows, Intern J. Appl Res Vet Med, vol 2, No.2

173. **F. Neijenhuis**, H. W. Barkema, H. Hogeveen, and J. P. T. M. Noordhuizen (2001), Relationship Between Teat-End Callosity and Occurrence of Clinical Mastitis, J. Dairy Sci. 84:2664–2672

174. **Nakov Dimitar**, Trajcev Metodija, (2012), Udder quarter risk factors associated with prevalence of bovine clinical mastitis, Mac Vet Rev 35 (2): 55-64

175. **Donagh P. Berry**, William J. Meaney, (2006), Interdependence and distribution of subclinical mastitis and intramammary infection among udder quarters in dairy cattle, Preventive Veterinary Medicine 75:81-91

176. **Metodija Trajcev**, Dimitar Nakov (2010), Distribution of abnormal secretion and subclinical mastitis among the udder quarters in dairy cows, Yearbook of the Faculty of agricultural science and food, Vol.55, 129-138, Skopje

177. **Berkema H.W**, Schukken Y. H, Lam T. J. G. M, Galligan D. T, Beiboer M. L, and Brand A. (1997), Estimation of interdependence among quarters of the bovine udder with subclinical mastitis and implications for analysis, J Dairy Sci: 80:1592-1599

178. **Evaldas Slyzius**, Vida Juozaitienė, Saulius Tusas, Arunas Juozaitis, Judita Zymantienė, (2013), Relation of udder quarter development with daily milk yield, composition and somatic cell count, Vet Med ZOOT. T. 63 (85)
179. Pamela L. Ruegg, (2017), A 100-year Review: Mastitis detection, management, and prevention, J. Dairy Sci. 100:10381-10397
180. **Tiago Tomazi**, Juliano Leonel Gonçalves, Juliana Regina Barreiro, Patricia Aparecida de Campos Braga, Luis Filipe Prada e Silva, Marcos Nogueira Eberlin, Marcos Veiga dos Santos, (2014), Identification of coagulase-negative staphylococci from bovine intramammary infection by Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, Journal of clinical microbiology vol. 52, no. 5 p. 1658-1663
181. **T. Banash**, M. Bochniarz, P. lyp, L. Adaszek, W. Wawron, B. Furmaga, M. Skrzypczak, J. Zietek, S. Winiarczyk, (2016), Application of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for identification of coagulase-negative staphylococci isolated from milk of cows with subclinical mastitis. Polish journal of veterinary sciences vol.19, No. 3, 627-632
182. Yasser S. Mahmmoud, Bettina Nonnemann, Line Svennesen, Karl Pedersen and Ilka Christine Klaas, (2018), Typeability of MALDI-TOF assay for identification of non-aureus staphylococci associated with bovine intramammary infection and teat apex colonization, J Dairy Sci. 101:1-9

БЛАГОДАРНОСТ

Огромна Благодарност до мојот ментор проф. д-р Дине Митров од Факултетот за ветеринарна медицина во Скопје кој ми остави слободен простор при изборот на темата за изработка на оваа докторска дисертација, како и за неговата стрпливост, постојана мотивација и насока при нејзината изработка.

Голема Благодарност до колегите доц. д-р Искра Цветковиќ и доц. д-р Мирослав Ќосевски од Факултетот за Ветеринарна медицина во Скопје за нивната голема подршка и сугестија при изработка на оваа дисертација бидејќи беа инволвирани во сите постапки.

Благодарност до проф. д-р Александар Димовски и м-р Сања Кипријановска од Истражувачкиот центар за генетско инжинерство и биотехнологија „Ѓорѓи Ефремов“ при Македонската академија на науките и уметностите, за нивната отвореност за соработка, стручност и конструктивност при идентификација на причинителите на СМ

Благодарност до м-р Љупчо Ангеловски и вет тех. Снежана Димитровска од Лабораторијата за сирово млеко при Факултет за ветеринарна медицина во Скопје, за континуираната соработка при анализите на млеката, како и конструктивната подршка.

За помошта при собирање на примероците на млеко им се заблагодарувам на вет тех. Ангелче Тодоровски од Ветеринарната клиника „Про-инфовајт“ - Петровец, како и на Филип Божиновски ДВМ., Димитар Божиновски ДВМ. и Бојан Смиљанов ДВМ.

Изразено голема Благодарност за: ентузијазмот, колегијалност и беспрекорната соработка при изборот на фармите, комуникација со самите фармери и теренска подршка до:

- Дарко Кузмановски ДВМ., од Ветеринарна клиника „Ветеринар ДК“ - Брвенца
- Бобан Малинов ДВМ., од Ветеринарна клиника „Ветерина Центар“ - Струмица
- Игор Стојановски ДВМ., од Ветеринарна клиника „Про-Инфовајт“ - Петровец
- Павлов Влатко ДВМ., од Ветеринарна клиника „Домазетовски“ - Велес

- Оливер Марковски ДВМ., од Ветеринарна клиника Мак-Маркетинг Требеништа
- Зоран Иванов ДВМ., од „Агенција за храна и ветеринарство” - Делчево
- Осман ДВМ., Ветеринарна клиника „Вет Градец” – Гостивар
- Златко Тековски ДВМ., од Ветеринарна клиника „Пела-вет” - Битола,

Му се заблагодарувам на моето семејство за истрајноста при изработката на оваа докторска дисертација, како и за нивната безусловната поддршка за да ова истражување биде комплетирано.