

**ЗАСТАПЕНОСТ НА ПАТОГЕНИ БАКТЕРИИ, НИВНА АНТИМИКРОБНА
ОТПОРНОСТ И ПОТЕНЦИЈАЛНИ РИЗИК-ФАКТОРИ ЗА ПОЈАВАТА НА
СУПКЛИНИЧКИОТ МАСТИТИС НА МАЛИТЕ КРАВАРСКИ ФАРМИ ВО
РЕПУБЛИКА СЕВЕРНА МАКЕДОНИЈА**

Клучни зборови: млечна жлезда, субклинички маститис, причинител, млеко, број на соматски клетки, застапаност, интамамарна инфекција, боска, фарма

**PREVALENCE OF PATHOGENIC BACTERIA, ANTIMICROBIAL RESISTANCE
AND POTENTIAL RISK FACTORS FOR THE OCCURRENCE OF SUBCLINICAL
MASTITIS IN SMALL SCALE DAIRY FARMS IN REPUBLIC OF NORTH
MACEDONIA**

Keywords: mammary gland, subclinical mastitis, cause, milk, somatic cell count, prevalence, intramammary infection, teat, farm

Скопје, 2021

Skopje, 2021

Ментор: проф. д-р Дине Митров

редовен професор на Факултетот за ветеринарна медицина во Скопје

Датум на одбрана: 16.07.2021

Членови на комисија:

проф. д-р Славчо Мреношки, претседател,

редовен професор на Факултетот за ветеринарна медицина во Скопје при Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје

проф. д-р Дине Митров, ментор

редовен професор на Факултетот за ветеринарна медицина во Скопје при Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје

проф. д-р Игор Цацовски, член

редовен професор на Факултетот за ветеринарна медицина во Скопје при Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје

проф. д-р Бранко Атанасов, член

вонреден професор на Факултетот за ветеринарна медицина во Скопје при Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје

проф. д-р Деан Јанкуловски, член

редовен професор на Факултетот за ветеринарна медицина во Скопје при Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје

СОДРЖИНА

ЛИСТА НА КРАТЕНКИ	1
ЛИСТА НА ТАБЕЛИ, СЛИКИ И ГРАФИКОНИ	3
РЕЗИМЕ	6
SUMMARY	10
1. ВОВЕД	13
2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРА	17
2.1 Анатомија на млечната жлезда.....	17
2.2 Одбранбени механизми на боската и каналот од боската.....	19
2.3 Маститис, поделба и начин на инфекција.....	21
2.4 Застапеност, начин на ширење, патогеност и превентива на најчестите предизвикувачи на супклинички маститис кај молзните крави.....	23
2.4.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	23
2.4.2 <i>Streptococcus uberis</i>	28
2.4.3 <i>Coagulasa negativni staphylococci</i>	30
2.4.4 <i>Streptococcus agalactiae</i>	33
2.5 Број на соматски клетки во млекото.....	37
2.5.1 Влијание на инфекцијата на млечната жлезда врз бројот на соматските клетки.....	38
2.5.2 Влијание на фазата на лактацијата, староста и бројот на телења врз бројот на соматските клетки.....	39
2.5.3 Влијание на стресот и сезоната врз бројот на соматските клетки во млекото.....	40
2.5.4 Нормални варијации во бројот на соматските клетки.....	41
2.5.5 Бројот на соматски клетки на ниво на стадо.....	41
2.5.6 Влијанието на високиот број соматски клетки врз количината и квалитетот на млекото.....	42
2.6 Влијание на хигиената на животните и хиперкератозата на крајот од боската врз бројот на соматските клетки и интрамамарната инфекција.....	45
2.7 Антимикробна отпорност, значење и застапеност кај предизвикувачите на супклинички маститис.....	47
3. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО	52
4. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ	53

4.1 Практики на молзење.....	53
4.2 Идентификација на молзните крави.....	55
4.3 Собирање на мострите/ примероците од млеко.....	55
4.3.1 Бактериолошка изолација на примероците од млеко и утврдување на позитивните четвртини и крави.....	56
4.3.2 Идентификација на бактериските причинители со примена на MALDI-TOF MS.....	57
4.3.3 Утврдување на бројот соматски клетки во млекото.....	59
4.3.4 Класификација на млечните четвртини во однос на бројот на соматските клетки и интрамамарната инфекција.....	59
4.4 Оценување на хигиенската оценка на различни области од телото на кравите.....	60
4.5 Утврдување на степенот на хиперкератоза на каналот од боската.....	61
4.6 Утврдување на антиминобната отпорност на причинителите што се најмногу распостранети во различни фарми.....	61
4.7 Статистичка анализа.....	43
5. РЕЗУЛТАТИ.....	65
6. ДИСКУСИЈА.....	87
7. ЗАКЛУЧОЦИ.....	126
8. ПРЕПОРАКИ.....	129
9. СПИСОК НА КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА.....	131

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
Сl	хлор
КМ	клинички маститис
СМ	супклинички маститис
БСК	број на соматски клетки
КМТ	калифорнија маститис тест
б/а	бактерија
CoNS	coagulasa negativni staphylococci
ЗБИРНО МЛЕКО-	примерок од млеко собран од сите четвртини на една крава
МЛЕКО ПО ЧЕТВРТ-	примерок од 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
год.	година
ИММ	интрамамарна
ИМ	интрамускуларна
CFU	(colony forming units англ.) број на видливи колонии формирани на агарната плоча
μl	микролитар
МИК	минимална инхибиторна концентрација

ЛИСТА НА ТАБЕЛИ, СЛИКИ И ГРАФИКОНИ

Листа на табели

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

Табела 2. Локација на фармата и број на молзни крави во истата..

Табела 3. Изолирани микроорганизми од мострите млеко.

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

Табела 5. Прикажан е обсегот на БСК на ниво на секоја четвртина посебно и на ниво на крава од трикратното анализирани примероци на млеко.

Табела 6. БСК $\times 10^3$ во четвртините од каде се изолирани бактерии.

Табела 7. Просечен број соматски клетки кај кравите групирани според степенот на чистота на одредени области од телото.

Табела 8. Детален приказ на бројот на четвртини според СМ класификација и нивната локација.

Табела 9. Застапеност на најчесто изолираните бактерии во четирите четвртини (PL= предна лева, PD = предна десна, ZL = задна лева и ZD = задна десна четвртина).

Листа на слики

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

Листа на графикони

Графикон бр. 1. Процент од испитани четвртини ($n=1.490$), класифицирани според микробиолошкиот наод и БСК.

Графикон бр. 2. Број на соматски клетки во млекото 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.

Графикон бр. 3. БСК во четвртините каде што се изолирани најчестите бактерии во студијата.

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

Графиконите со број 5А, 5Б и 5В, ги прикажуваат процентите на усогласеност на микробиолошкиот наод при едно (А), две (Б) и три (В) мострирања со финалната микробиолошка класификација на испитуваната четвртина.

Графикон бр. 6. Оценка на чистота на различни области од телото кај испитуваните крави.

Графикон бр. 7. Корелација помеѓу застапеноста на СМ во испитуваните фарми и процентот на крави со чисто млечно огледало.

Графикон бр. 8. Процент на четвртини според степенот на оштетување на боската.

Графикон бр. 9. Приказ на степенот на оштетување на боските и споредба со бројот на соматски клетки и четирите најфреквентни причинители.

Графикон бр. 10. Приказ на вкупниот број оштетени боски по категорија (сина линија, 1-4) и процент на четвртини со изолиран причинител.

Графикон бр. 11. Процент на четвртини со микробиолошки изолати од вкупно испитаните PL= предна лева, PD = предна десна, ZL = задна лева и ZD = задна десна четвртина.

Графикон бр. 12. Процентуална застапеност на најчесто изолираните бактерии во четирите четвртини (PL= предна лева, PD = предна десна, ZL = задна лева и ZD = задна десна четвртина).

Графикон бр. 13. Просечен БСК на кравите со МЖ под скочниот зглоб (ПС) и кравите со МЖ над скочниот зглоб.

Графикон бр. 14. Ја прикажува АМО на најфреквентните причинители на СМ во однос на најчесто употребуваните антибиотици во млечната индустрија.

РЕЗИМЕ

Маститисот сè уште претставува најраспространета и наважна економска болест кај млечните крави насекаде во светот, а воедно носи и најголема загриженост за благосостојбата на кравите. Според клиничката слика маститисот е поделен на клинички и супклинички маститис. Супклиничкиот маститис (СМ) е дефиниран како воспаление на млечната жлезда без видливи клинички знаци, и во тоа е основниот проблем - што СМ не може да се утврди без изведување дијагностички тестови. Тој е широко распространет во краварските фарми, каде на еден клинички маститис доаѓаат 15-40 случаи на СМ. Досега се откриени околу 135 различни бактериски видови како потенцијални предизвикувачи на СМ, а во многу помал број се изолирани и: квасци, алги, габи, хламидии и вируси. Според нивните карактеристики, најчестите маститис патогени бактерии се поделени на: **Заразни/контагиозни маститис патогени бактерии и Околински маститис патогени бактерии.**

Целта на ова истражување беше да се утврди застапеноста и најчестите причинители на СМ, да се изнајде оптимална алатка за негова дијагностика и да се потврдат или негираат хигиената на телото и хиперкератозата како ризик-фактори за негова појава. Дополнително да се одреди антимицробната отпорност на дел од најчестите причинители на СМ.

Истражувањето беше спроведено во период од април 2018 до март 2020 год., на 24 краварски фарми на различни локации на територијата на Република Северна Македонија. Средната големина на стадата беше 13 молзни крави, и притоа најмалата фарма имаше 4 крави, додека најголемата имаше 51 крава во лактација. Истражувањето беше спроведено на 384 крави во лактација, вкупно испитани 1496 четвртини.

Од вкупно испитаните крави 284 (74%) беа прогласени со позитивен статус на СМ, а 100 крави (26 %) беа со негативен статус. 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

изолтатите), а недиференцирани беа 65 изолати (12,29 % од изолтатите). Најдоминатни од изолираните причинители беа : *CoNS* 23%, *Streptococcus uberis* 16%, *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* со по 9%, додека од групата *CoNS* најдоминантни беа : *Staphylococcus haemolyticus* 41%, *Staphylococcus chromogenes* 14% и *Staphylococcus simulans* 9%.

Од севкупните испитани четвртини 56% беа класифицирани како В (БСК $<200 \times 10^3$ и без миробилошки наод), 25% беа V (БСК $>200 \times 10^3$ и миробилошки наод), 10% како М (БСК $>200 \times 10^3$ и без миробилошки наод), и 9% N (БСК $<200 \times 10^3$ и со миробилошки наод). Минималниот просечен БСК каде е изолиран причинител е 15×10^3 кл/мл кај *Aerococcus urinaeequi*, а максималниот изнесува 10.374×10^3 кл/мл кај *Streptococcus agalactiae*. Кај најчесто изолираните бактерии просечниот БСК значително е понизок кај *CoNS* (735 ± 146) во однос на другите најчести бактерии од $1.406 - 2.065 \times 10^3$, F (3, 271) = 8.15, $p < 0.001$. Во четвртините каде што имаше утврден микробиолошки наод, БСК се движеше од 15×10^3 до 10.374×10^3 со просечна вредност на БСК од $11.975 \times 10^3 \pm 1.573 \times 10^3$.

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 CFU) беа истотака класифицирани и по трите мострирања.

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. Помеѓу застапеноста на CM и средните вредности на чистотата на различни делови од телото во фармите не се утврди значајност при корелација, но при спроведената Spearman Rank корелација се утврди значајна позитивна корелација меѓу процентот на крави со чисто огледало наспроти застапеноста на CM. При споредбите меѓу групите на бројот на соматските клетки и чистотата на поедини партии, односно на МЖ, млечното огледало, нозете, бутовите и слабините, не се утврди статистички значајна разлика. Иако студијата не можеше да утврди значајни разлики и асоцијативност меѓу чистотата на одредени делови на телото со БСК на ниво на крава,

сепак се забележуваат повисоки вредности на БСК кај кравите оценети со 4 во однос на чистотата на нозете.

Според степенот на оштетување, бројот на боски изнесуваше 1097 калсифицирани со 1 (без оштетување), 266 со степен на оштетување 2, 98 боски со трет степен и 32 боски со четврт степен на оштетување. Утврдена е значителна разлика во БСК меѓу различно оштетените боски. Притоа се утврди разлика на БСК меѓу оштетувањата од прв и втор степен во однос на БСК во боските од четврт степен, како и меѓу прв и трет степен. Се утврди дека не постои значајна разлика меѓу застапеноста на сите видови бактерии и оштетувањата. Исто така, и при анализата на четирите најзастапени видови бактерии во студијата не се утврди статистички значајна разлика меѓу овие бактерии кај различните оштетувања на боските.

Во однос на утврдување одредена поврзаност меѓу 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. При споредба меѓу застапеноста на најчестите бактерии изолирани во различните четвртини од МЖ, поточно нивната доминација во одредена четвртина, не се утврди значителна доминација на конкретна бактерија во одредена четвртина. Сепак, со тестот на прилагодени резидуали се утврди значително повисок број изолати на *CoNS* во ЗЈ 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 наспроти оние со МЖ над скочниот зглоб.

Кај *S. uberis* АМО беше утврдена на ampicillin (3.5%), erythromycin (7%), riflymicin (29%) и tetracycline (46%), исто така и *S. agalactiae* покажа висок степен на отпорност пред се на tetracycline (75%) и (17%) на oxacilline. *S. aureus* беше отпорен на два антимикробни лекови одн. на ampicillin (25%) и penicillin (29%), додека од 6 испитани изолати на *E.coli* 3 изолати беа отпорни на tetracycline додека 2 беа отпорни serhalothin, каде еден изолат беше отпорен и на двата антимикробни лека.

Резултатите од ова истражување ја утврдија моменталната застапеноста и етиологијата на СМ. Од добиените резултати се изнајде оптимална алатка за негово дијагностицирање со интегрираност на БСК и ИМИ, како и присуството на АМО кај

најчестите причинители. Исто така, хиперкератозата ја потврди како ризик-фактор за појавата на СМ, но не и хигиената на тело.

SUMMARY

Mastitis is still the most prevalent and the most expensive disease in dairy cows around the world, and is also a major concern for the wellbeing of cows. According to the clinical picture, mastitis is divided into clinical and subclinical mastitis. Subclinical mastitis (SM) is defined as inflammation of the mammary gland with no visible clinical signs, and this is the underlying problem - that SM cannot be diagnosed without performing diagnostic tests. It is widespread in dairy farms, where the ratio of is 15-40 cases of SM to one clinical mastitis. So far, about 135 different bacterial species as potential causes of SM have been identified, and in much smaller numbers: yeasts, algae, fungi, chlamydia and viruses have been isolated. According to their characteristics, the most common mastitis pathogenic bacteria are divided into: **Infectious / contagious mastitis pathogenic bacteria and Surrounding mastitis pathogenic bacteria.**

The aim of this research was to determine the prevalence and the most common causes of SM, to find an appropriate tool for its diagnosis and to confirm or deny the body hygiene and hyperkeratosis as risk factors for its occurrence, as well as to further determine the antimicrobial resistance of some of the most common causes of SM.

The research was conducted from April 2018 to March 2020, on 24 dairy farms at different locations on the territory of the Republic of Northern Macedonia. The average size of the herds was 13 dairy cows, with the smallest farm having 4 cows, while the largest had 51 lactating cows. The research was conducted on 384 lactating cows, examining a total of 1496 quarters.

Out of the total examined cows, 284 (74%) were declared with positive status of SM, and 100 cows (26%) had negative status. According to the microbiological examination of 1,496 quarters, 66.0% were negative, while 33.6% were positive for microbiological findings, and 0.4% were quarters with clinical mastitis.

To the level of microorganisms, 50 different species were identified, i.e. 458 isolates (86.58% of the isolates); to the genus level (spp.) 2 different genera were identified (*Streptococcus* and *Corynebacterium*), i.e. 6 isolates (1.13% of the isolates), and 65 isolates (12.29% of the isolates) were undifferentiated. The most dominant of the isolated causative agents were: *CoNS* 23%, *Streptococcus uberis* 16%, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* with 9% each, while the most dominant from the *CoNS* group were:

Staphylococcus haemolyticus 41%, *Staphylococcus chromogenes* 14% and *Staphylococcus simulans* 9%.

Of the total examined quarters, 56% were classified as B (somatic cell counts $<200 \times 10^3$ and without microbiological findings), 25% were V (somatic cell counts $>200 \times 10^3$ and microbiological findings), 10% as M (number of somatic cells $>200 \times 10^3$ and without microbiological findings) and 9% N (number of somatic cell $<200 \times 10^3$ and with microbiological findings). The minimum average somatic cell count where the causative agent is isolated is 15×10^3 cl / ml in *Aerococcus urinaeequi*, and the maximum is 10.374×10^3 kg/ml in *Streptococcus agalactiae*. In the most commonly isolated bacteria, the average number of somatic cells was significantly lower in *CoNS* (735 ± 146) than in the other most common bacteria of $1.406\text{--}2.065 \times 10^3$, $F(3, 271) = 8.15$, $p < 0.001$. In the quarters with the established microbiological findings the somatic cell counts ranged from 15×10^3 to $10,374 \times 10^3$ with an average somatic cell count value of $11,975 \times 10^3 \pm 1,573 \times 10^3$.

Regarding the number of samples taken and in comparison with the final microbiological status of the quarter, it has been confirmed that with samples taken only once, 95% of the samples declared as N (negative finding) have also been classified as N in the final microbiological finding (after three samplings). On the other hand, 74% of the samples that were classified as C (> 50 CFU) during the first test, were classified the same after the three samplings.

The average for the mammary gland cleanliness was 1.91; for the milk mirror cleanliness was 2.36; for the leg cleanliness was 2.64; for the thigh cleanliness was 3 and for the groin cleanliness was 2. Between the prevalence of SM and the mean values of the cleanliness of different parts of the body in the farms no significant correlation was found, but the Spearman Rank correlation showed a significant positive correlation between the percentage of cows with a clean mirror versus the prevalence of SM. Comparing the groups of the somatic cell counts and the cleanliness of individual parts, i.e. the MG, the milk mirror, the legs, the thighs and the groin, no statistically significant difference was found. Although the study could not determine significant differences and associations between the cleanliness of certain parts of the body with the somatic cell counts in a single cow, higher values of the somatic cell counts were noticed in cows rated 4 regarding the leg cleanliness.

According to the degree of injury, the number of udders classified with 1 (without injury) was 1097, 266 with a degree of injury 2, 98 udders with degree 3 and 32 udders with

degree of injury 4. A significant difference was found in the somatic cell counts between the differently injured udders. There was a difference in the somatic cell counts between the first and second degree injuries in relation to the somatic cell counts in the fourth degree udders, as well as between the first and third degree. It was determined that there is no significant difference between the prevalence of all types of bacteria and the injury. Also, the analysis of the four most common types of bacteria in the study did not find a statistically significant difference between these bacteria in different injuries of the udders.

Regarding the determination of a certain connection between the location of the quarters and their classification according to SM (IMI and the somatic cell count), no significant difference was determined between the number of SM classified quarters and their location. When comparing the prevalence of the most common bacteria isolated in different quarters of the MG, more precisely their dominance in a certain quarter, no significant dominance of a specific bacterium in a certain quarter was found. However, the adjusted residual test found a significantly higher number of *CoNS* isolates in the rear left compared to all three other bacteria and quarters.

Cows with mammary gland below the ankle were found to have significantly higher somatic cell counts in milk than those with mammary gland above the ankle.

AMR of *S. uberis* was assessed for ampicillin (3.5%), erythromycin (7%), pirlymicin (29%), and tetracycline (46%). *S. agalactiae* had high AMR to tetracycline (75%) and oxacilline (17%). *S. aureus* had high AMR to ampicillin (25%) and penicillin (29%). In six *E.coli* isolates, three had high AMR to tetracycline and two to cephalothin. One of these isolates had high AMR on both antibiotics.

The results of this research determined the current prevalence and etiology of SM. From the obtained results, an appropriate tool was found for its diagnosis with integration of somatic cell counts and IMI, as well as the presence of antimicrobial resistance in the most common causes. Hyperkeratosis was also confirmed as a risk factor for the occurrence of SM, and not the body hygiene.

1. ВОВЕД

Маститисот сè уште претставува најраспространета и најважна економска болест кај млечните крави насекаде во светот и предизвикува најголема загриженост за благосостојбата на кравите. Маститисот е воспаление на млечната жлезда, независно од 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 супклинички маститис. **Клиничкиот маститис** се карактеризира со видливи промени, т.е. формирање на партали/згрутчувања во млекото, оток и болка на самата млечна жлезда, како и можна промена во целокупната здравствена состојба на кравата (*депресија, апатија, хипертермија*). **Супклиничкиот маститис** е дефиниран како воспаление на млечната жлезда без видливи клинички знаци и во тоа е основниот проблем кај оваа форма - што не може да се утврди без примена на дијагностички тестови.

Супклиничкиот маститис е широко распространет во краварските фарми каде што на еден клинички доаѓаат во просек 15-40 случаи на супклинички маститис. Недијагностицираните крави со супклинички маститис се потенцијален извор на инфекција за здравите крави и стада. Исходот од супклиничкиот маститис може да биде: **а)** да дојде до самоизлекување, **б)** да премине во клиничка форма и **в)** да премине во хронична форма на маститис. Хроничниот маститис претставува супклинички маститис со долго траење, прогресивна индурација на паренхимот и изразено намалено производство на млеко. Загубите од супклиничкиот маститис се еноормни и се должат на: намалено производство на млеко, трошоци за лабораториски услуги, ветеринарни услуги и лекови, отфрлање на млекото од крави што се третирани со антибиотик, како и прерано исклучување од производство на молзните крави.

Досега се дијагностицирани околу 135 различни бактериски видови како потенцијални предизвикувачи на супклинички маститис, а во многу помал број се изолирани и други видови на микро(организми): квасци, алги, габи, хламидии и вируси. Според нивните карактеристики, најчестите маститис патогени бактерии се поделени на:

* **заразни /контагиозни (*major* англ.) маститис патогени бактерии и**

* **околински (*minor* англ.) маститис патогени бактерии.**

Бројот на соматските клетки присутни во млекото од лактофризерот ја покажува застапеноста на маститисот во стадото 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 супклиничкиот маститис на ниво на четвртина, млечна жлезда и стадо. На бројот на соматските клетки влијаат бројни фактори, од кои со најголемо значење се: предизвикувачите на маститис (микроорганизми, токсини и оштетено ткиво) и, во многу помала мера, физиолошко-фармаколошки фактори (раса, стадиум од лактација, лекови) и стресни фактори (начин на молзење, транспорт, сместување, промена на исхраната и др.). Супклиничкиот маститис, а индиректно и бројот на соматските клетки, е во директна корелација со физички, хемиски и бактериолошки промени во млекото и со патолошка трансформација на самиот паренхим на млечната жлезда. Корелацијата меѓу составот на млекото и бројот на соматските клетки е документирана од многу автори.

Во текот на последниве неколку децении примената на конкретни контролни програми за превенција на маститисот резултирала со намалување на застапеноста на интрамамарните инфекции, но пред сè на инфекциите што се предизвикани од големите/контагиозните патогени микроорганизми, додека сè 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 сè на изворите на овие патогени микроорганизми, како што се: почвата, изметот и простирката, сите присутни во системите за сместување на молзните крави, како и постоечката флора на кожата од боската.

Хигиената може да се користи како индикатор на 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 области од телото донекаде укажува и на хигиенската состојба во самата штала, т.е. на 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 за 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. Како фактори кои можат да доведат до промени на крајот од боската (*hyperceratosis*) се: несоодветно управување со молзењето, апаратот за молзење и практиките кои се применуваат при молзење.

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 оздравувањето на болните животни, ја подобрува благосостојбата на третираниите животни и го спречува/намалува ширењето на инфекцијата на други животни или, во случај на зооноза, и на луѓето. Антимикробната отпорност претставува голем 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 животните на луѓе и од луѓето на животни. Дополнителна загриженост при пренесување на отпорните бактерии предизвикуваат заразените животни коишто немаат видливи клинички симптоми. Во ветеринарната медицина антимикробните супстанции широко се употребуваат кај животните за терапија, профилакса и метафилакса. Антибиотскиот третман на клиничкиот и супклиничкиот маститис кај млечните крави е воспоставена компонента во програмите за контрола на маститисот. Во тој поглед загриженоста за јавното здравје е од два аспекта, и тоа: внесување антимикробни остатоци и пренос на резистентни патогени микроорганизми. Ризик за луѓето постои особено кога сличен антимикробен препарат се користи и кај животните и кај луѓето или постои вкрстена отпорност меѓу антимикробните средства што се користат во хумана и ветеринарна практика. Супклиничкиот маститис пред сè се смета за проблем затоа што тој не се детектира навреме и може континуирано да претставува извор на резистентни бактерии во лактофризерот од каде, преку сировите млечни производи, може да влезат во ланецот на исхрана на луѓето.

Во развиените европски земји се прават задолжителни контроли за утврдување на застапеноста на супклиничкиот маститис на краварските фарми, идентификација на

причинителите, се користат најсовремени контролни мерки во неговата превенција, утврдување на ризик-фактори што влијаат врз појавата на супклиничкиот маститис, како и употреба на антибиотик само со претходно утврдување на антиминокробна осетливост. За разлика од нив, Република Северна Македонија сè уште нема детални податоци за застапеноста на супклиничкиот маститис и на неговите причинители, а вклучително и антиминокробната отпорност, утврдени ризик-фактори, како и препишани мерки/протоколи за негова ерадикација.

1. 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: инфекцијата, патогенезата, терапијата и превентивата од маститисот.

Млечната жлезда (*Glandula lactifera, uber, mamma, mastos* лат.) претставува модифицирана потна жлезда, со тубуло-алвеоларна структура и ендокрина функција, којашто е тесно поврзана со гениталните органи и претставува секундарна полова карактеристика кај женските животни [1, 2]. Таа е сместена на вентралниот дел од абдоменот во ингвиналната регија [1], која кај високопродуктивните млечни крави кранијално може да се протега блиску до самиот папок, а каудално до просторот меѓу задните нозе [2]. Поради својата поставеност на вентралниот дел од абдоменот и просечната тежина од 25 кг кај празна МЖ, заедно со создаденото млеко, таа може да достигне тежина и до 70 кг [3]. Затоа МЖ силно е фиксирана со суспензаторен систем што се состои од: кожа, плиток и длабок латерален и медијални суспензорни лигаменти [4, 5]. Кожата, како дел од суспензорниот систем, формира слабо поврзување меѓу дорзалната површина на предните четвртини и абдоминалниот сид [2]. Таа е тенка, еластична, лесно подвижна, обрасната со нежни влакна, во неа има потни и лојни жлезди [1, 2]. Плиткиот латерален суспензорен лигамент е од фиброзно ткиво и започнува од супкарличните 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 недозволува истегнување на МЖ кога таа е полна со млеко [2] и претставува значајна поткрепа за МЖ. Тој започнува од супкарличните тетиви, ја обложува скоро целата МЖ и испушта бројни ламели што поминуваат низ жлезденото ткиво и влегуваат во состав на интерстициумот на МЖ и се поврзуваат со медијалниот суспензорен лигамент [5]. Медијалните суспензорни лигаменти се најважни (два на број) и почнуваат од дното на карлицата, поминуваат низ средината на МЖ и завршуваат на абдоменот [5]. Тие се изградени од сврзно ткиво што има својство да се истегнува кога МЖ се полни со млеко особено пред актот на молзење. Како што стареат кравите, МЖ ја зголемува својата тежина, медијалните суспензорни лигаменти често ослабуваат, ја губат селастичноста дозволувајќи им на боските да се истакнуваат

према надвор (*латерално*), што може да доведе до тешкотии при прицврстувањето на чашките за молзење на боските, како и проблеми со 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 дели четвртините, т.е. мамарните комплекси на предни и задни [6], тоа значи дека не постои никаков премин на млечни канали меѓу млечните четвртини и секоја претставува посебна единица [2, 3]. Задните четвртини учествуваат со 55-60% од вкупната тежина на МЖ [2], додека Tancin V. et al. [7] во својата студија наведуваат дека од вкупниот принос на млеко 47% се добива од предните четвртини, додека 53% од задните четвртини.

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

Боската (*papilla mammae*) е делот од МЖ низ кој се излучува млекото. Нејзината 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. [8] 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. Voboš S. et al. [2] 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. 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 10-50 мл, површината може да е мазна или со хоризонтални, односно лонгитудинални набори (3), а е обложена со двослоен кубичен епител [9]. Непосредно кај соединувањето на цистерната на боската и каналот на боската, 6-10 надолжни набори од цистерната се конвергираат во т.н. розета на Фурстенберг (*Furstenberg rosette* англ.) [3]. Млекото од цистерната се излучува надвор преку изводен канал (*ductus papilaris*) кој е со просечна должина 6-14 мм [1], додека дијаметарот се движи од 0,4 мм на дисталниот крај до 1,63 мм на проксималниот крај, и во просек изнесува 0,46 мм, кој со стареење се издолжува

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

Жлезденото тело (*corpus mammae*) има лобусна градба, при што 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 понатаму се влеваат во млечната цистерна (*sinus lactiferous*) која што служи за складирање на млекото пред да премине во цистерната на боската, и неговиот волумен е 500 мл [1]. Алвеолите се основна и посебна градбена единица на МЖ одговорни за синтеза и секреција на млекото, со пречник во просек 0.1-1.3мм [2]. Алвеолите однатре 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 окситоциноот предизвикуваат истиснување на млекото од тубуло-алвеоларниот лумен во одводните млечни канали [1, 9].

2.2 Одбранбени механизми на боската и каналот од боската

Млечната жлезда поради својата анатомска поставеност, а особено боските, постојано е во контакт со најразлични патогени микроорганизми (М/О) што 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 [5]. Кожата на боските е обложена со заштитна прекривка од масни киселини што 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, што се пренесуваат преку крвотокот [12]. Маститис патогените М/О поминуваат во МЖ со цел да најдат средина која е топла, влажна и богата со хранливи материи, неопходни за нивен раст и размножување [12]. Исходот од колонизацијата на боската зависи од повеќе фактори, но пред сè од: вирулентноста на причинителот, здравствената состојба на животното, како и од имунолошкиот систем на МЖ [13]. Каналот од боската претставува прва одбранбена линија против маститисот [11, 15]. Својот ефект го постигнува како физичка бариера и извор на антимикробни супстанции [12, 16]. Околу самиот изведен канал се наоѓа мазен мускулен свинктер со спирална форма кој со својата активност го затвора 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 што 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 што 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 трипати на ден имаат пониска инциденца на маститис од кравите што се молзат двапати во текот на денот [17]. Освен физичката улога, кератинот во изводниот канал има и антимикробни својства [11, 13]. Тој содржи: бактериостатски естерифицирани и неестерифицирани типови масни киселини (лаурицилни, палмитски и линолејни киселини) и фибрински (vlakнестни) протеини. Овие киселини и протеини електростатски се поврзуваат со маститис патогените М/О, менувајќи им го клеточниот ѕид со последователна промена на осмотскиот притисок, лиза и смрт [12, 16]. Paulrud C. A. [10] во својот труд наведува дека различниот липиден состав во каналот има различен бактериостатски ефект кон одредени маститис патогени М/О. Дополнително, катјонските протеини, присутни во кератинот, со електростатски сили се врзуваат за бактерискиот ѕид и имаат инхибиторен ефект [14, 16], особено кон некои патогени М/О, како што се: *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, и *Klebsiella pneumoniae* [12, 16]. Овие катјонски протеини исто така се изолирани и од говедски неутрофили [11, 13].

Alfonso Z. et al. [13], наведуваат дека иако машинското молзење е незаменлива алатка во современото одгледување на молзни крави, сепак укажуваат на три негативни последици од истото, и тоа: проксимално придвижување на маститис патогените М/О, зголемена контаминација на надворешниот канал и промена во одбранбениот потенцијал на боската. 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 сепак не значи и развој на инфекција [2].

2.3 Маститис, поделба и начин на инфекција

Настанувањето на маститисот најчесто е последица на постојаната борба меѓу бактериите што можат да се населат во внатрешноста на четвртината и одбранбените механизми кои што настојуваат да ги елиминираат [6]. Маститисот сè уште претставува најраспространета и најважна економска болест кај млечните крави насекаде во светот [18, 19, 20, 21, 22], а воедно носи и најголема загриженост за благосостојбата на кравите [23, 24]. Маститисот е воспаление на МЖ независно од 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 супклинички маститис. **Клиничкиот маститис (КМ)** се карактеризира со видливи промени, т.е. формирање на партали/згругчувања во млекото, оток и болка на самата МЖ, како и можна промена на целокупната здравствена состојба на кравата (*депресија, апатија, хипертермија*) [24]. **Супклиничкиот маститис (СМ)** е дефиниран како воспаление на МЖ без видливи клинички знаци, и во тоа е основниот проблем кај оваа форма - што не може да се утврди без примена 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]. Супклиничкиот маститис е широко распространет во краварските фарми, каде на еден клинички доаѓаат 15-40 случаи на СМ [17, 28]. Недијагностицираните крави со СМ се потенцијален извор на инфекција за здравите крави и стада, а ненавременото третирање може да доведе до индурација на жлезденото ткиво од МЖ [17, 21, 29]. Исходот од СМ може да биде: **а)** да дојде до

самоизлекување, **б**) да премине во клиничка форма, и **в**) да премине во хронична форма која всушност претставува СМ со долго траење, со прогресивна индурација на паренхимот и изразено намалено производство на млеко [6].

Економските загуби од СМ се должат на:

- намалена млекопродукција, (69% од вкупните загуби од СМ се како последица на намалената продукција на млеко;
- отфрлање на абнормалното млеко, како и млекото од животни третирани со антибиотици;
- намалување на квалитетот и цената на млекото како последица на високиот број на бактерии и БСК;
- трошоци за лекови (претставува болест за која се трошат најмногу антибиотици) и трошоци за ветеринарни и лабораториски услуги;
- зголемен ризик од појава на клинички маститис.

Освен тоа, значењето на СМ се огледа и во тоа што:

- претставува втора болест како причина за прерано исклучување на кравите од производство после репродуктивните причини;
- претставува извор на зараза за здравите крави во самото стадо или/и за другите краварски фарми;
- доведува до проблеми со присуство на резидуи од антибиотици во млекото и млечните производи, како и развојот на антиминокробна отпорност [11, 18, 21, 22, 29, 30].

Инфекцијата на млечната четвртина може да настане:

- **галактогено** – влезот на маститис патогените М/О се случува преку каналот на боската и понатаму преку цистерната и млеководите, сè до алвеоларните простори. Овој начин на инфицирање го користат најголем број од причинителите на маститис.

- **хематогено** – 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 интралобуларно и интраалвеоларно ткиво.

- **лимфогено** – ширењето на инфекцијата се одвива во лимфните отвори и долж лимфните садови, каде што примарна врата и место на размножување се раните на кожата или убоди од инсекти што 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

Досега се откриени околу 135 различни бактериски видови како потенцијални предизвикувачи на СМ [30], а во многу помал број се изолирани и: квасци, алги, габи, хламидија и вируси [12].

Според нивните карактеристики, најчестите маститис патогени 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 случаи како причинители се вбројуваат и: *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Nocardia*, *Protothecae* и др.

2.4.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) претставува грам-позитивна, неподвижна, аспорогена, факултативно анаеробна топчеста бактерија, којашто по делбата може да

остане единечна, 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, нехемолитички, па и коагулаза негативни [33].

S. aureus пред сè е маститис патоген кај говедата, што 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 меѓу луѓето и кравите [34]. Освен кравите, *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 може да биде и повисока од 30% до 85% [24].

Главен резервоар на *S. aureus* е хронично инфицираната МЖ, каналот на боската и лезиите на боската, а може да се најде и на кожата од боската и МЖ, како и во репродуктивниот тракт, муцката, ноздрите, простирката, воздухот во молзилиштето и опремата за молзење [33, 34, 35, 36]. Инфекцијата со *S. aureus* најчесто настанува во првите две недели после или 7-10 дена пред телењето [37]. Инфекцијата во стадото се шири преку: машината за молзење, крпите што се користат за бришење, рацете на молзачот, несоодветните практики кои се користат при молзењето и инсектите [6, 38]. Мувите кои ги трауматизираат боските можат исто така да ја пренесуваат инфекцијата [34]. Во студија каде што е користен инсектицид нанесен на самата опашка се развил само еден маститис на 100 јуници, споредено со контролната група каде што се развиле 18 маститиси на 100 јуници [38]. Во стадото инфекцијата може да се внесе преку внесување нови животни, т.е. молзни крави и јуници. И првотелките претставуваат резервоар за *S. aureus*, бидејќи е евидентирана релативно висока застапеност кај нив, и тоа од 12-15% [38]. Најчесто инфекцијата кај првотелките е настаната како последица на заемно цицање во групните боксови, пиење 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 размножува, 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 вакуумот 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 бактеријата може постепено да се искачи во проксималните млечни канали и алвеолите или да се дисеминира преку леукоцитите [2, 34]. Со оглед на тоа што *S. aureus* може да преживува во леукоцитите, откако тие ќе умрат (во просек за 1 до 2 дена), на нова локација би го ослободиле причинителот [34, 38].

Повеќето автори се согласни дека после навлегувањето на *S. aureus* во четвртината, во понатамошниот тек на инфекцијата може да се развијат четири различни форми маститис [34, 38]:

- супклинички маститис

- хроничен маститис (*mastitis et galactoforitis catarrhalis chronica / interstitialis fibrosa seu apostematosa*): се карактеризира со зголемен БСК и намалена количина и квалитет на млеко, каде перзистенцијата може да трае во текот на целата лактација, со голема веројатноста да се пренесе и во следните лактации. После подолг период од траењето на инфекцијата доаѓа до атрофија на четвртината како последица на индурација со сврзно ткиво, а во некои случаи може да се формира и апсцес со големина на тупаница, што некогаш може да ја зафати и целата четвртина.

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

- гангренозен маститис или перакутен маститис (*mastitis necroticans-haemorrhagica*): се развива со изразено брз тек, видливо нарушена општа здравствена состојба, со ладна МЖ на која се појавува црвено-сино обојување во пределот на основата на боските и излучување на криво млеко. Доколку се изостане со навремена терапија, најчесто завршува со летален исход.

Понатамошниот тек на инфекцијата, односно во каква форма ќе се развие маститисот, зависи од: состојбата и активноста на одбранбените механизми 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: фагоцитоза на млечните компоненти што 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, обложување на неутрофилите со казеин и губење на неутрофилната псевдоподија [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: фактори на површината од бактеријата и секреторни фактори [39].

1. **Вирулентните фактори на површината** од *S. aureus* се најважни при неговата адхеренцијата, а се изразуваат кога бактеријата е во фаза на раст. Тие се:

- **Протеин А (SpA):** има големо влијание во адхезијата, создава агрегати 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 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. [42] наведуваат дека независно од првичната функција, Clf-A има силно антифагоцитно делување што се надоврзува со дејството на протеин А.

- **Капсуларен полисахарид** е ектополисахариден слој што го покрива клеточниот ѕид кај некои соеви на *S. aureus* и може да биде флексибилна микрокапсула или цврста капсула [39], која влијае во превенцијата од фагоцитозата и опсонизацијата [32, 41, 42], како и адхеренцијата на бактеријата и нејзината перзистентност [41, 44].

- **Слузавата обвивка** е ектополисахаридна компонента лабаво врзана на површината што може лесно да се изгуби во *in vitro* услови [39]. Таа има карактеристична особина за групирање на бактериите во микроколони, а заедно со капсуларниот полисахарид може да послужат како примарни рецептори за адхезија или да се продуцираат откако бактериите веќе се адхерирале.

2. **Секреторните вирулентни фактори** го промовираат оштетувањето на ткивото, ширењето на инфекцијата и заштитата на бактеријата од имунолошкиот одговор на домаќинот, а се експонирани во постпотенцијалната 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 што 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 создава 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 забележуваат ослабени клетки и клеточен простор со мали празнини меѓу 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 така цитолитички токсин што го излучуваат 75-100% од соевите на *S. aureus* изолирани од маститис кај говедата [32, 43]. Тој го хидролизира сфингомиелинот присутен во плазматската мембрана, што резултира со нејзина зголемена пропустливост, при што доаѓа до истекување на K^+ , а влез на Na^+ , Cl^- и Ca^{2+} [39, 41]. Прогресивното испуштање јони доведува до губење на тургорот на клетката и распаѓање на електричниот потенцијал на плазматската мембрана, додека влезот на Ca^{2+} доведува до трошење на АТФ 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 поосетлива за адхерентност и инвазија од бактеријата, и затоа се мисли дека двата токсина имаат големо влијание во адхерентоста на *S. aureus*.

-**Леукоцидин** е цитолитички токсин што го произведуваат голем дел од говедските изолати во *in vitro* 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 што 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 што 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 притоа да не биде изолиран *S. aureus* [36]. Најчесто ентеротоксините се произведени од хуманите соеви на *S. aureus* [31].

Токсичен шок синдром токсин - I: има ефект врз адхерентноста, инвазијата и патогеноста на *S. aureus* во МЖ [39]. Се разликува од останатите ентеротоксини по тоа што се ресорбира низ цревата и има системски ефект, а не само локален на цревата [36].

Пријавени се различни проценти на стапката на излекување на маститисот предизвикан од *S. aureus*, и тој процент се движи од 4 до 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 лекување, што особено важи за СМ и хроничниот маститис, но сепак добиените резултати *in vitro* не значат секогаш и успех *in vivo* [45].

2.4.2 *Streptococcus uberis*

Streptococcus uberis (*S. uberis*) е грам-позитивна бактерија со кокоиден облик, групирана во парови или синцир, која предизвикува α - (или зеленкаста) хемолиза, а некои соеви се и не хемолитични [31, 46]. Бактеријата претставува убиквитарен микроорганизам што се наоѓа насекаде, на животните и во 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]. Во околината најчесто може да се најде во ѓубрето и другите органски материи што се користат како простирка, пред сè во сламата, а потоа и во пилевината [6, 47, 48].

Streptococcus uberis се смета и како околински и како заразен причинител на маститисот [5, 47, 49]. Извор за околинскиот маститис патоген причинител претставува животната средина на кравата при што инфекцијата може да настане во секој период од нејзиниот живот. Од друга страна пак, примарен резервоар за заразниот *S. uberis* претставуваат заразените МЖ, кај кои 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 сè е галактогена, а високиот број бактерии во животната средина ја зголемува инциденцата на инфекцијата [46]. Најчест период за инфекција е периодот од пресушувањето до раната лактација на кравите [5, 48, 50], и како причина за тоа е престанокот на молзењето и испирањето на самиот канал од боската. Leigh J. A. [48] 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. Подоцна каналот на боската станува поотпорен за пенетрација, но се зголемува подложноста на жлездата. Лактопероксидаза-тијоцианат-водород пероксид е антибактериски систем на МЖ кој ја штити од бактериската инфекција, а за време на пресушниот период се намалува неговата активност против *S. uberis* [47]. Douglas V. L. [47] прикажала позитивна корелација помеѓу инциденцата на инфекција и возраста на животното, додека Zadoks R. N. et al. [49] утврдиле зголемена застапеност од реинфекција со *S. uberis* во четвртините што биле заздрави од истиот причинител.

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 адхереноста на *Streptococcus agalactiae* и *S. aureus* [47]. Исто така, Douglas V. L. [47] наведува дека *S. uberis* во *in vitro* услови не може да адхерира на здраво млечно ткиво. 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, при што инкапсулираните соеви се поотпорни [47, 48] и во капсулата содржат хијалуронска киселина која ја инхибира активната опсонизација на говедските

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 изведе за време на пресушувањето на кравата [50], пред сè со интрамамарна апликација на антибиотикот. Супклиничкиот маститис предизвикан од *S. uberis* не е подобен за лекување во периодот на лактацијата, освен ако не е клинички маститис бидејќи лекуваните четвртини стануваат поподложни на реинфекција [49].

2.4.3 *Coagulasa negativni staphylococci*

Coagulasa negativni staphylococci (CoNS) последните децинии се најчест причинител на маститис кај кравите [52], особено на фармите што успешно ја спровеле програмата за контрола против контагиозните причинители на маститис [6, 53]. Застапеноста на СМ и КМ во различни земји е различна и се движи во опсег од 6-72% и 6-30% [53].

Coagulasa negativni staphylococci се хетерогена група бактерии којашто се состои од 45 различни видови и подвидови [54], но кај кравите најчесто изолирани се: *Staphylococcus chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. xylosus*, *S. hyicus*, *S. sciuri* и *S. intermedius* (53). Сепак, како најдоминантни причинители на СМ се: *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. haemolyticus*, *S. xylosus* и *S. 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 што се користат за простирка. *S. chromogenes* е добро прилагоден на самите крави и може да се изолира од кожата на МЖ кај јуниците, како и од каналот на боската, секретите од новоотелените јуници и крави во лактација, исто така и од носот и вагината [56]. *S. epidermidis* е редок или отсутен од микрофлората кај говедата, но е добро прилагоден на кожата на човекот и е чест причинител на маститис кај жените [24]. *S. haemolyticus* е изолиран од кожата на МЖ [56]. *S. xylosus* и *S. sciuri* често се детектирани како дел од

нормалната микрофлора на кожата кај кравите, како и кај други цицачи и птици, а *S. xylosus* често се користи како starter-култура во ферментацијата на млекото [53, 56]. *S. hyicus* најчесто се сретнува кај КМ кај кравите и ексудативниот дерматитис кај свињите, додека *S. simulans* се среќава и кај КМ и СМ [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 забележувани и маститиси со тешки клинички знаци [53]. Сепак, другата загриженост е повисоката застапеност на β -лактамската продукција кај *CoNS* во споредба со *S. aureus*. Во Шведска тој процент бил 35% наспроти 15% од изолатите на *CoNS* и *S. aureus* изолирани 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* е највисока кај првотелките, а многу пониска кај кравите што се породувале повеќепати. Кај првотелките инфекцијата настанува најчесто пред и по отелувањето (рана лактација), додека кај кравите кои раѓале повеќепати 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 *S. chromogenes* со 28%, а останатите *CoNS* (*S. hominis*, *S. simulans*, *S. epidermidis*) биле изолирани во помалку од 3.5% [53]. *CoNS* пред сè ги зафаќаат кравите со највисока продукција на млеко [56]. Дистрибуцијата меѓу видовите на *CoNS* била различна, т.е. *S. chromogenes* најчесто е изолиран кај првотелките пред и по отелувањето [52, 53, 56]. *S. epidermidis* најчест е кај кравите што се породувале повеќепати [53, 56], додека *S. simulans* подеднакво е застапен и кај првотелките и кај кравите што се породувале повеќепати, но во подоцнежниот период од лактацијата [52, 56].

CoNS можат да предизвикаат и перзистентни инфекции што резултираат со умерено зголемување на БСК во млекото 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 подвидови бактерии со различни патогени карактеристики, добиени се и 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 последица на заштитата на МЖ од инфекција од големите маститис патогени М/О. *S. chromogenes*, *S. epidermidis* и другите *CoNS* лачат антибактериски пептиди со протективна функција во спречувањето на населувањето во МЖ на големите маститис патогени М/О [24, 57]. *In vitro* е потврдено дека *S. chromogenes* произведува инхибиторни супстанции што го инхибираат растот на *S. aureus*, *S. uberis* и *Streptococcus dysgalactie*, но не и на *Escherihia coli* [52, 57]. Исто така, зголемиениот БСК во четвртината не дозволува да се развијат нови инфекции [52], додека Pierers S. et al. [59] додаваат дека колонизацијата на боските кај јуниците со *CoNS* пред породувањето ја заштитува МЖ од околинските и заразните патогени М/О во раната лактација.

При хистолошки преглед на четвртините инфицирани од *S. aureus* и *CoNS* покажале хроничен воспалителен одговор со знаци на репарација, но не биле забележани никакви индивидуални промени во хистолошките наоди меѓу *S. aureus* и *CoNS* [53, 58]. Капацитетот за адхезија на видовите на *CoNS* кон епителните клетки од МЖ е речиси еднаков со адхезивниот капацитет на *S. aureus* и оттука доаѓа и стимулацијата на имунолошкиот одговор кај кравите, т.е. зголемување на БСК. Но, од друга страна инвазивноста на *CoNS* е помала од онаа на *S. aureus* и на тој начин потенцијално предизвикуваат помало оштетување на секреторното ткиво [53, 55]. *CoNS* изолирани од СМ произведуваат ентеротоксин [53], додека, пак, *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. hyicus* и *S. 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 глувци биле инакулирале изолати на *S. aureus*, *S. chromogenes* и *S. intermedius* добиени од хроничен маститис. Дури и најмалку вирулентните соеви на *S. aureus* биле повирулентни и од *S. chromogenes* и *S. intermedius* [60].

Стапката на спонтано излекување на СМ предизвикан од *CoNS* е висока, Krishnamoorthy P. et al. [53] пријавиле дека таа може да достигне до 60-70%. 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 предизвикуваат маститис кај млечните стада ширум светот [61, 62, 63]. Тој е предизвикувачки агенс на неколку болести кај разни други животински видови, вклучувајќи ги и луѓето. Најчесто предизвикува животното загрозувачки болести кај новороденчиња, пред сè: пневмонија, синдром на септички шок и менингитис со висока стапка на смртност [64, 65, 66]. Кај молзните крави во Јужна Америка пријавената застапеност во стадата се движи од: 60% во Бразил, 42% во Колумбија и 11% во Уругвај [61, 67, 68, 69]. Во Данска веќе неколку децении е воспоставена национална програма за искоренување, но и покрај значителното намалување на застапеноста кон крајот на 1980-тите и почетокот на 1990-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 како и во останатите скандинавски земји [62, 71].

S. agalactiae во ветеринарната медицина (или уште 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 сивкасти колонии со тесно подрачје на β -хемолиза, а ретко α или γ -хемолиза [31, 70]. Предизвикува пред сè СМ со хроничен тек, без можност за самоизлекување, а во ретки случаи и благ КМ којшто исто така понатаму преминува 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], и перманентен висок БСК [68, 73], којшто може да достигне 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 внесување инфицирани крави и притоа, поради тивката и контагиозната природа, многу брзо се шири меѓу кравите (64). *S. agalactiae* може да расте и да се размножува само во МЖ која претставува главен резервоар за овој патоген [63, 64, 68, 73]. Се пренесува од крава на крава, пред сè за време на постапката на молзење, 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 многу 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 неговиот опстанок во околината на фармата [73]. Бидејќи перзистира на рацете на молзачите, особено кога рацете на молзачите се со рагади, тоа 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 без видливи клинички знаци, а со помал процент на колонизација биле урогениталниот тракт и грлото [73, 66]. Jørgensen H. J. et al. [73] во своето истражување утврдиле дека орофекалното пренесување на *S. agalactiae* може да биде од епидемиолошко значење кај млечните крави. *S. agalactiae* е пронајден во ректалните брисеви од млечните крави и брисевите од околината, со значителна корелација меѓу 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 евентуално загадената опрема за хранење. Не е познато колку често овие циклуси на пренесување се во интеракција, но за да се елиминира *S. agalactiae* од стадото потребна е и интервенција во орофекалниот 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. Исто така постои и сомнеж дека со заемно цицање на телињата, тиа да ја пренесат инфекцијата од едни на други, но 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 Voboš S. et al. [2] и Goran B. [6] се согласни и го опишуваат начинот на инфекција, т.е. дека *S. agalactiae* во МЖ влегува пред сè преку каналот на боската. 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 оттука, пак, може да навлезе во лимфните садови и мамарните лимфи

јазли. Исходот од хроничниот тек е активирање на макрофагите и фибробластите во интраалвеоларниот 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]. *S. agalactiae* е способен да колонизира различни ткива во телото, т.е. вирулентност меѓу бактериските соеви е поврзана во разликите во способноста да: адхерираат, инвадираат и се шират во епителот на МЖ [61, 62, 66]. Maoda P. et al. [62] наведуваат дека говедските соеви на *S. agalactiae* се најспособни за адхезија на мамарниот епител, раст во млеко, предизвикувајќи целосна хемолиза на крвниот агар и најсилно формиран биофилм, споредено со изолатите што потекнуваат од луѓето, околината и рибите. Свкупно, постои значителна хомологија меѓу соевите изолирани од септикемични новороденчиња и маститични крави [68].

Познати се повеќе вирулентни фактори на *S. agalactiae*, но најчесто утврдени кај изолатите од СМ се :

- **Полисахаридната капсула** на *S. agalactiae* е најважниот фактор на бактериска вирулентност, којашто има можност да го промовира адхерирањето на бактеријата за епителните површини, заедно со инхибирањето на фагоцитозата од макрофагите и неутрофилите [61, 72]. Таа е богата со сијална киселина која ѝ овозможува на бактеријата да навлезе во телото на домаќинот без да биде детектирана од имунолошкиот систем [61, 72]. Сијалната киселина е позната како N-ацетил-неураминска киселина и ја има обилно во телото на 'рбетниците, каде што е вклучена директно во различни физиолошки и патолошки промени [72]. До денес се идентификувани 10 капсуларни полисахаридни серотипови кај оваа бактерија [61].

- **Фибриноген врзувачки протеин Б (fbsB) и фибриноген врзувачки протеин А (fbs A)** се пред сè одговорни за адхезијата и инвазијата на *S. agalactiae* [66]. *FbsB* има способност за врзување со фибриногенот кај различни животински видови, независно 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 што имаат говедско потекло [61]. Gleib A. et al. [61] во своето истражување констатирале многу мала застапеност на *fbsA* во изолатите на *S. agalactiae* што 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. Со ова се согласни и Clarisse M. A. et al. [72] кои што укажуваат дека *fbxA* 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.

- **Протеинот *hlyB* 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 коишто се прицврстени за нејзиниот клеточен ѕид [72]. Тие се одговорни за колонизација на епителните клетки, формирање 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-1a се одговорни за прилепувањето и формирањето на биофилмот, додека PI-2b има посебна улога во промовирањето на инвазивноста, т.е. зголемување на интрацелуларниот опстанок во макрофагите [66]. Опстанокот во макрофагите доведува до негова заштита без да се прикажат клинички симптоми, што резултира 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 (*bibA*)** е протеин со улога во адхезијата, има мала фреквенција кај изолатите од говедата, што укажува дека не е од суштинско значење и најверојатно неговата функција ја изведува друг протеин [61]. Спротивно на изолатите од говеда, кај изолатите од луѓето докажано е дека со поголема експресија на *bibA* се зголемува адхерентноста на *S. agalactiae* за епителното ткиво [66].

И покрај неговата контагиозност, *S. agalactiae* сè уште останува чувствителен на β -лактамските антибиотици [69, 70]. Во принцип и со двата главни начини за третман на маститис: интрамускуларна (ИМ) и интрамамарна (ИММ) апликација, за што постојат бројни студии каде што се добиени променливи резултати, сепак рутата за ИММ апликација најчесто е избрана за третман на СМ предизвикан од овој патоген [70].

Искоренувањето на овој маститис патоген причинител е тежок и долготраен процес, за што укажува и податокот од Keefe G. P. [68] кој 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.

2.5 Број на соматски клетки

Бројот на соматските клетки во вкупното млеко 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:

- директни методи: *Fossomatic 2*, и *Coulter Milk Cell Counter* [18] или
- Индиректни методи: Калифорнија маститис тест (КМТ) [78] и Ват сајд тест (*White side test* англ.) [23]

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

Во млекото од неинфицираната млечна четвртина доминираат макрофагите (35%), потоа полиморфонуклеарните леукоцити (26%), лимфоцити (24%) и епителни клетки (15%) [74]. Најчестиот просек на епителните клетки е меѓу 1-7% и тоа се изумрени клетки од алвеолите и кератинскиот слој на боската, а 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 неинфицираната четвртина/МЖ [23, 74].

На БСК влијаат бројни фактори, пред сè и од најголемо значење се: предизвикувачите на маститис (М/О, токсини и оштетено ткиво), а со многу помал степен влијаат физиолошко-фармаколошките фактори (раса, стадиум од лактација, лекови) и стресни фактори (начин на молзење, транспорт, сместување, промена на исхраната и др.) [17,74].

2.5.1 Влијание на инфекцијата на МЖ врз бројот на соматските клетки

Најважниот фактор што 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 што го започнува инфламаторниот одговор [6, 17, 23, 76], т.е. преку бројни воспалителни медијатори предизвикува: 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 1-11% [17], при инфекција нивната процентуална застапеност достигнува и до 90% од вкупните 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 моноклеарните 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 што се зголемува бројот на инфицирани четвртини. Интензитетот на промена на БСК спрема најзначајните маститис патогени М/О варира од крава до крава. По елиминацијата 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 соматски клетки

Бројот на соматските клетки во млекото, т.е. колострумот по породувањето најчесто е повисок од 1.000.000 кл./мл [76]. Тоа е последица на прекумерната десквамација на епителните клетки поради продолжената функција на МЖ по пресушниот период и малиот волумен на млеко во тој период [23]. За 7-10 дена по породувањето БСК се намалува на околу 100.000 кл./мл, само доколку МЖ не е инфицирана [23, 76]. Макрофагите во раниот постпартален период се застапени околу 68% од вкупниот 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 сè до 90-тиот ден од лактацијата, а по тој период почнува да се зголемува.

Мицковски Ѓ. и сор. [1] наведуваат дека 7-от ден по отелувањето БСК бил 273.150 кл./мл, 90-тиот ден нивниот број изнесувал 67.180 кл./мл, а 300-тиот ден по породувањето бројот се подигнал на 895.130 кл./мл. Додека Hristov S. et al. [77] во својот преглед укажуваат на поврзаноста помеѓу БСК и стадиумот на лактација во четвртините што се инфицирани и оние што не се инфицирани. Кравите коишто не биле инфицирани 35-тиот ден по породувањето имале 83.000 кл./мл, додека 285-тиот ден по породувањето БСК се искачил на 160.000 кл./мл. За истиот тој период кај инфицираните четвртини со *S. aureus* тој број бил 234.000 кл./мл и се искачил на 1.000.000 кл./мл. Zrinka Ch. et al. [75] наведуваат дека кривата на БСК во млекото е обратнопропорционална во однос на лактациската крива. Со овој податок се согласуваат и многу други автори кои укажуваат дека во неинфицираните четвртини има незначително зголемување на БСК кон крајот на лактацијата, особено кога производството на млеко ќе се намали под 4 кг како последица на разредување на млекото [1, 18, 77].

Во однос на староста и бројот на лактации, БСК се зголемува како што се зголемува бројот на телења и староста на самото животно, а особено кај кравите кои се инфицирани [17, 23, 75, 76]. Старите крави се склони кон подолготрајна инфекција [75] и зголемувањето на БСК примарно е како последица на зголемената застапеност на инфекции и перманентното оштетување на паренхимот на МЖ кај нив [17, 18, 76]. Особено е важно што постарите крави имаат поинтензивен клеточен одговор во однос

на малите и големите маститис патогени М/О [18]. Кравите со висок генетски потенцијал за продукција на млеко поради физиолошкото оптоварување на МЖ, а со тоа и намалувањето 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 БСК во млекото

Направени се повеќе експериментални опити за предизвикување стрес кај кравите, но кај сите се добива податок дека кај неинфицираните четвртини има незначително зголемување на БСК, што е во спротивност со инфицираните четвртини [18, 75]. Кај неинфицираните крави аплицирани се кортикостероиди, под строго контролирани услови, и добиени се умерени зголемувања на БСК или, пак, воопшто немало зголемување [77]. Правени се и опити со тоplotен стрес, при што имало значително зголемување на БСК, но тоа било последица на намалената млекопродукција, која при тоplotен стрес може да се намали за 10-20 % [77]. Еструсот како стрес не предизвикува значителни промени во БСК [18, 77]. Различни типови стрес незначително го зголемуваат БСК во неинфицираните четвртини, но значително го зголемуваат во инфицираните четвртини, т.е. го активираат/забрзуваат воспалението [77].

Бројот на соматските клетки е највисок во текот на летото (*јули/август*), а најнизок во зима [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. [81] 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). Ваквата состојба се објаснува со зголемената температура и влажност која како последица има зголемен број патогени М/О во околината на самата крава. Сето тоа резултира со зголемена контаминација на врвот на боските и зачестена појава на маститис [23, 76, 77].

2.5.4 Нормални варијации во БСК

Потврдено е дека има нормални варијации на разредување на БСК во примероците млеко што се земани во различно време од молзењето и меѓу молзењата [77]. Бројот на соматските клетки е највисок при домолзувањето или веднаш по молзењето и ова ниво перзистира уште околу 4 часа (18, 75). Потоа постепено опаѓа до најниско ниво што се јавува непосредно пред следното молзење [18, 77]. Овие разлики во текот на самото молзење или магнитудата меѓу најнискиот и највисокиот БСК во четвртината може да варира 4-70 пати [23, 76, 77]. Коефициентот на месечни варијации на БСК во стадото може да варира 4-46 % [18], додека коефициентот на дневните варијации на БСК по стадо е 24% [18, 75]. Sharma N. et al. [23] наведуваат дека дневната варијација може да биде и повеќе од 40%. 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 помеѓу 59 и 301% [18].

2.5.5 Број на соматски клетки на ниво на стадо

Бројот на соматски клетки во стадото се индикатор на процентот на инфицираните четвртини во стадото [82]. Во најразвиените млечни индустрии се применуваат различни регулаторни граници (БСК вредности на ниво на стадо) за млекото што се користи за хумана употреба. 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 <350.000 кл./мл.

Четиристотини 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], а просекот на БСК во стадото се зголемува како што се зголемува и бројот на инфицирани четвртини [23]. Во препораките дадени од National Mastitis Council (NMC) (2001) се укажува дека доколку просекот на БСК во лактофризерот е <200.000 кл./мл, тогаш до 15% од кравите во стадото се инфицирани со една или повеќе четвртини, додека 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 од <400.000 кл./мл индицира инфицираност на

една третина од кравите, додека, пак, просекот од <700.000 кл./мл укажува на инфицираност на две третини на кравите во стадото [83].

Многу слични податоци наведуваат Sharif A. et al. [17]. Кога просекот на БСК во стадото е 200.000 кл./мл, вредност која претставува мерна точка за маститисот, укажува дека се инфицирани 6% од четвртините во стадото, кога просекот е <500.000 кл./мл, тоа укажува на инфицираност на 16% од четвртините, а доколку просекот на соматските клетки во стадото е $1.000.000$ кл./мл, инфицираноста може да достигне и до 32%.

2.5.6 Влијание на висок БСК врз количината и квалитетот на млекото

Супклиничкиот маститис е во директна корелација со физички, хемиски и бактериолошки промени во млекото и патолошката 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].

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

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 лактоза 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, рН на млекото е малку пониско од онаа на крвта (*т.е. повеќе кисел*): 6.7 наспроти 7.4 [5]. Супклиничкиот маститис, т.е. зголемениот БСК е во негативна корелација со концентрацијата на лактоза во млекото [17, 76, 85, 87, 88, 93]. Fernandes A. M. et al. [85] во истражувањето за влијанието на БСК врз концентрацијата на лактоза во млекото го спровеле на две различни фарми, при што во првата фарма месечниот просек бил <500.000 кл./мл, додека во втората фарма просекот на БСК бил $>1.000.000$ кл./мл. Тие во своето тримесечно истражување добиле

постепено намалување на концентрацијата на лактозата во млекото како што се зголемувал БСК. Во првата фарма при месечен просек на БСК од 143.000, 180.000 и 549.000 кл./мл концентрацијата на лактоза била 4.56, 4.49 и 4.36% последователно, додека во втората фарма при месечен просек на БСК од 2.330.000, 1.187.000 и 3.432.000 кл./мл концентрацијата на лактоза била 4.31, 4.36 и 3.62% последователно. Исто така, Klei. L. et al. [90] при споредба на млеко со 83.000 и 870.000 кл./мл констатирале намалување на концентрацијата на лактоза од 4.98 на 4.71%. Кога 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 по малку солен вкус на маститичното млеко [5].

Поголемиот дел од протеините во млекото се во форма на казеин, при што аминокиселините се пренесуваат до МЖ преку крвотокот и се трансформираат во казеин од страна на мамарните алвеоларни клетки и од нив се екстрадираат во млекото. Изненадувачки е дека енергетската компонента во исхраната има голем ефект врз содржината на казеин во млекото, додека протеините внесени преку храната имаат релативно мало влијание врз содржината на протеините во млекото. Другите типови протеини присутни во млекото кои се во мали количини се албумините и глобулините што се пренесуваат од крвта во млекото [5]. Речиси сите автори се согласни дека во млекото со зголемување на БСК се зголемува или задржува истата концентрацијата на вкупни 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. [84] наведуваат дека СМ може да предизвика намалување на концентрацијата на казеинот и/или зголемување на концентрацијата на серумските протеини во зависност од тежината на патолошкиот процес. Покрај тоа маститичното млеко содржи зголемено ниво на ендогениот ензим плазмин којшто 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 постапката 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 меѓу мастите и БСК се контрадикторни. Fernandes A. M. et al. [85] не добиле никаква корелација меѓу БСК и

концентрацијата на мастите ниту кај кравите со висок ниту кај кравите со низок БСК [32, 40, 85]. Gonchalves J. L. et al. [91] правеле споредба на млекото меѓу заразените и здравите четвртини од исти крави, при што утврдиле зголемена концентрација на мастите во млекото од четвртините инфицирани со контагиозни патогени М/О, споредени со контралатералните здрави четвртини, 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, што доведува до повисоки нивоа на слободни масни киселини во млекото [5, 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	<100x10 ³ /ml	<250x10 ³ /ml	500-1000x10 ³ /ml	> 1 000x10 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

Примарно, намалениот принос на млеко од инфицираните четвртини е последица на намалената синтеза на лактозата [89] која делува како растворувач и е одговорна за преминот од крвта во млекото, така што помала концентрација на лактоза води кон помал млечен принос [86]. Секундарно, бактериските инфекции предизвикуваат оштетување на млечниот секреторен епител на МЖ и влијаат на вкупниот принос на млекото, при што ваквото оштетување некогаш може да резултира и со трајно губење на капацитетот на МЖ за синтеза на млеко [17, 88]. *Bezman D. et al.* [93] 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*. Иако не била забележана значајна разлика во дневниот принос на млеко по крава, што највероватно е поради компензацијата на другите четвртини, сепак квалитетот на млекото бил намален и при една инфицирана четвртина, при што БСК на севкупното млеко од кравата може да биде зголемен и за >4 пати. Во однос на четвртините инфицирани со *CoNS* и споредбата со контралатералните здрави четвртини, *Bezman D. et al.* [93] освен зголемен БСК не добиле никаква разлика во приносот на млеко.

Различни автори во своите истражувања добиле слични или пак 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* *анг.*) 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 ефективностa на одбранбениот механизам се двата клучни фактори што 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 овие патогени М/О кои вклучуваат почва, измет и постелка, сите присутни во објектите 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 каде бактериите можат да се пренесат од лежиштата на самите боски [94].

Еден контролен третман не се покажал дека е ефикасен во елиминирање на ИМИ од околинските извори [94, 98], па затоа сè повеќе треба да се намалува изложеноста на боските на околината, како и подигање на степенот на хигиена во фармите [94]. Хигиената се користи како еден од индикаторите 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 вакви крави може да влијае и на времето потрошено за молзење и потребата од квалификувани работници кои можат правилно да ја извршат процедурата на миење на МЖ/боските [6, 96]. Во некои случаи сепак миењето 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 области од телото донекаде 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 за 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, ако се знае

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 меѓу стапката на отстранување на кератинот за време на молзењето, како и нејзиното регенерирање. Благата хиперкератоза на крајот од боската е нормален физиолошки одговор кон силите наметнати од машинското молзење [98]. Несоодветното управување со молзењето, како и апаратот за молзење како фактор можат да доведат до хиперкератозни промени на крајот од боската [98, 99]. Кравите што имаат споро испуштање на млекото, висока продукција и голема разлика во продукцијата меѓу предните и задните четвртини се повеќе склони кон хиперкератоза на крајот од боската [6]. Neijenhuis F. et al. [19] наведуваат дека зголемената хиперкератоза на крајот од боската се појавува при примена на дезинфекција по молзењето, што најверојатно е последица на хемиската иритација од некои од дезинфициенсите. 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 по молзењето е многу потешка и нејзината ефективност е намалена [100].

2.7 Антимикробна отпорност, значење и застапеност кај предизвикувачите на СМ

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 бактериски инфекции се фатални, предизвикуваат болка, како и намалување на ефикасното производство на храна од животинско потекло [103]. Кратко време по употребата на антибиотиците почнале да се појавуваат податоци за отпорноста на некој бактерии кон одредени антибиотици. Во 1948 год. изолираните соеви на *S. aureus* од британските болници покажале отпорност кон пеницилинот. Истата година, непосредно по првата употреба на лекот, забележана е отпорност кон стрептомициниот од изолатите на *Mycobacterium tuberculosis*. Во 1960

год. утврдена е отпорност на *S.aureus* кон метицилинот (MRSA) и на *Enterococcus spp.* спрема ванкомицин (VRE) [101].

Светската здравствена организација (WHO) антимикуробната отпорност ја дефинира како отпорност на микроорганизмот спрема антимикуробниот лек којшто првично бил ефикасен за лекување на инфекциите предизвикани од него. Антимикуробната отпорност (АМО) претставува светски проблем, како во хуманата така и во ветеринарната 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 луѓе и од луѓе на животни [104, 103, 106, 107]. Дополнителна загриженост претставуваат заразените животни што немаат видливи клинички симптоми, како што е и СМ [108]. Преносот на отпорните бактерии од животни на луѓе најчесто е преку консумирање продукти од животинско потекло (месо, млеко, јајца), директен контакт со колонизираните животни или со ѓубриво распространето по животната средина [103, 106, 108]. Пред сè работниците на фармите и кланиците, вклучувајќи ги и ветеринарите, имаат голем ризик да бидат колонизирани/заразени со отпорни бактерии преку директниот контакт со заразните/колонираните. Понатаму, тие можат да претставуваат канал за влез на отпорните бактерии/детерминанти во заедницата, болниците и животната средина [104]. Кога отпорните бактерии се зоонози и можат да се пренесат преку контаминирана храна, тие предизвикуваат директна закана во однос на здравјето на луѓето. Исто така и кога бактериите не се зоонози, сепак претставуваат опасност за луѓето кои ги внесуваат, бидејќи може да бидат извор на генетски материјал за некои други бактерии што се патогени за човекот [107]. Антимикуробната 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].

Антимикуробната отпорност никогаш не би се развила кај животните доколку кај нив не се користат антимикуробни лекови [103, 106]. Најчеста причина за развој и ширењето на АМО е несоодветната употреба на антибиотици, вклучително постојаната неконтролирана апликација, внесување на суптерапевски дози и ненамерна изложеност на луѓето на антимикуробни резидуи во храната (млеко, месо, јајца) и околината [106, 107].

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 кон антибиотикот се отсутни во бактеријата. На пример, микоплазмите се отпорни на пеницилин поради отсуството на клеточен сид [105, 107, 109], или, пак, грам-негативните бактерии се природно отпорни на ванкомицин поради структурата на нивниот клеточен сид што се разликува од клеточниот сид кај грам-позитивните бактерии [104].

-Стектата отпорност се јавува поради хромозомска мутација или примање генетски материјал. Хромозомските мутации претставуваат случаен и бавен етапен процес при што доаѓа до промени на структурата на бактериската клетка како последица на промена во секвенцата на ДНК. Преносливата плазмидна отпорност, како вид примање 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 бактериофаг и потоа истиот ја пренесува на друга бактерија;

2). Конјугација е чест процес на трансфер на гени, каде бактеријата-донор синтетизира секс пили со кои се поврзува со бактеријата-примател и во овој процес на парење, копии од 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 и кај претставниците на ист вид, како и помеѓу различни родови и фамилии на бактерии.

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

Бактериите можат да ги избегнат дејствата на антибиотиците користејќи разновидни механизми и тоа: а) ензимска инактивација на антибиотиците; б)

намалување на бактериската пермеабилност; в) промена на целните рецептори; и д) отстранување на антимикуробните лекови преку efflux-пумпите [107]. Од клиничка гледна точка најголем проблем претставува efflux-системите, што доведува до отпорност кон повеќе антибиотици без нивна модификација. Efflux-пумпите ја намалуваат акумулацијата на соединенија (вклучувајќи различни/несродни антимикуробни лекови) бидејќи ги испумпуваат во периплазматскиот простор или директно во надворешниот медиум [104].

Употребата на антибиотиците што се користат кај животните е скоро двојно поголема од онаа што се користи кај луѓето [103, 104]. Поради сличностите меѓу поголемиот дел ветеринарни и хумани антимикуробни средства, лесно се доаѓа до вкрстена отпорност, т.е. развивање на отпорност на различни антибиотици кои припаѓаат на исти фармаколошки групи [104]. Во ветеринарната медицина антимикуробните супстанции широко се употребуваат кај животните за терапија, профилакса и метафилакса [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].

Супклиничкиот маститис пред сè се смета за проблем затоа што тој не се детектира навреме и може континуирано да излучува отпорни бактерии во лактофризерот од каде преку сировите млечни продукти може да се пренесе на луѓето [113, 114]. Најрелевантни примери се отпорните бактерии што предизвикуваат маститис, *S. aureus* или *CoNS* или отпорните бактерии што се присутни во околината на млечните крави, како што се ентерококите. Иако ентерококите и *CoNS* имаат само ограничено клиничко значење во производството на млеко, нивната убиквитарност и честото носење на гени за АМО е причина за загриженост [113].

Неминовна е строга контрола во користењето антибиотици со цел да се избегне брзата појава на АМО на новите антимикуробни соединенија. Особено кога зголемувањето на отпорноста може да порасне до степен кога антибиотикот повеќе не може да се користи како опција за третман кај молзните крави (што веќе се случува за *penicillin G*) [115].

Загриженоста за јавното здравје има два аспекта, и тоа: внесување антимикуробни остатоци преку прехранбениот ланец и пренос на отпорни патогени М/О. Времето на повлекување на антибиотиците или каренцата е наменето за спречување на

антимикробни остатоци во млекото, месото и јајцата [106]. Овој период треба строго да се контролира затоа што прехранбените производи што содржат антимикробни остатоци претставуваат главен резервоар којшто може да придонесе за развој на АМО и кај луѓето [107, 112].

3. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО

Главна цел на ова истражување беше да се одреди застапеноста на СМ и неговите причинители, каде според добиените резултати да се направи проценка за примена на најдобрите алатки и процедури кои може да се користат за утврдување и контрола на СМ во краварски фама во Република Северна Македонија. Да се утврди дали хигиената на различни области од телото и хиперкератозата на боските се ризик-фактор при појавата на СМ како и во интерес на јавното здравје пред се, да се одреди присутноста на антимицробната отпорност кај најфреквентните причинители на СМ.

Поединечно, специфични цели на истражувањето се:

1. Да се одреди застапеноста на СМ и идентифицираат најчестите бактериски 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 утврди оптимална алатка којашто може да се користи во утврдување на СМ на малите краварски фарми во РСМ.
5. Да се испита влијанието на хигиената на телото и хиперкератозата 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 РСМ.

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 Република Северна Македонија. Средната големина на стадата беше 13 молзни крави, и притоа најмалата фарма имаше 4 крави, додека најголемата 51 крава во лактација. Истражувањето беше спроведено на 384 крави во лактација (Табела 2). Пресушените крави, јуниците и телињата не беа вклучени во вкупниот број прикажани животни на фармата. Сите фарми опфатени во ова истражување беа со врзан систем на одгледување преку целата година. Испитуваните фарми користеа ист начин на хранење, со исклучок на фарма бр.1 која за хранење на кравите користи автоматско систем (TMR - *total mixed ration* англ.). Од вкупно 24 краварски фарми, во 16 фарми хранењето и молзењето го правеа самите сопственици, додека во останатите 7 и хранењето и молзењето е изведувано од страна на работници. Сите фарми користеа органски материјал за простирка, пред сè слама, а многу мал број фарми користеа и пилевина за простирка.

4.1 Практики при молзење

На сите фарми се применуваше машинско молзење и кравите се молзеа на истото место каде што беа сместени. Во сите краварски фарми се применуваше двократно молзење (наутро и навечер), освен во една фарма (фарма бр.16) каде кравите се молзеа трикратно. Како хигиенски практики при молзењето на фармите се применуваше чистење на МЖ пред молзење со топла вода, и за сите крави се користеше истата крпа. Бришењето, т.е. сушењето на МЖ беше иста така со иста крпа за сите крави или воопшто и не се сушеше. Само на две фарми (фарма бр. 12 и 21) се применуваше миење на МЖ со вода под притисок, односно се миеше целата МЖ која потоа се оставаше сама да се исуши. На други две фарми (фарма бр. 1 и 5) се применуваше потопување на боските по молзење во дезинфекционо средство и тоа не за време на целата лактација. Антибиотско пресушување на МЖ се применуваше само доколку имало видливи промени на млекото од четвртината или доколку МЖ имала историја на КМ или намалена млекопродукција.

Табела 2. Локација на фармата и број на молзни крави во истата

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	Кривогаштани	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	

P- фарми кои користат туѓа работна снага

4.2 Идентификација на молзните крави

Сите крави затекнати на фармата беа заведени во однос на ушната маркица и дополнително имаа доделен интерен број. Староста, т.е. датумот на раѓање и податоците за расата на кравата беа земени од картонот за идентификација на говедото издаден од Агенцијата за храна и ветеринарство на РСМ. Најзастапени раси од испитаните крави беа: источно-фризиска раса со 63%, расата црвен-холштајн и симентал со 9% и расите браун-свис и холштај-фризиска 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 петнаесетпати.

4.3 Собирање мостри/примероци млеко

Примероците млеко беа земени на ниво на четвртина, трикратно, во период 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 млеко, додека микробиолошко испитување беше направено на 3.551 примерок на млеко. Примероци млеко не беа земени од кравите до 10 дена по отелувањето и кравите што биле третирани со антибиотици поради различни патолошки состојби до осмиот ден од апликација на антибиотикот. За истражувањето беа земани примероци на млеко од четвртини кај кои при адспекција и палпација не беа утврдени патолошки промени (*оток, болка, атрофија, апсцес*).

Примероците за БСК и микробиолошко испитување беа земени истовремено од страна на едно лице, според препораките зададени од NMC [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 броење 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 (*мл, пд, зл, зд*).

За земање примероци 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 коешто ги зема мострите. Во обратен редослед од секоја боска во стерилни туби од 15мл, претходно обележани со истиот интересен број и локација на четвртината, беа земени од 1 до 3 млаза млеко. Земените примероци 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 Лабораторијата за микробиологија при ФВМС. Примероците млеко веднаш беа засадувани на хранливи подлоги (Blood agar base-Biolife збогатен со 5% овча крв). Од секој примерок беше инокулирано по 0.01мл на плоча и секоја беше обележана 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 до 48 часа. По инкубацијата на секоја плоча се изведуваше 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 две последователни земања на мострите се правеше морфолошка споредба на колониите. Примероците млеко каде што беа утврдени морфолошки идентични колонии од двете последователни земања 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 примарни 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 времетраење од 24 до 48 часа.

4.3.2 Идентификација на бактериските причинители со примена на MALDI-TOF MS

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

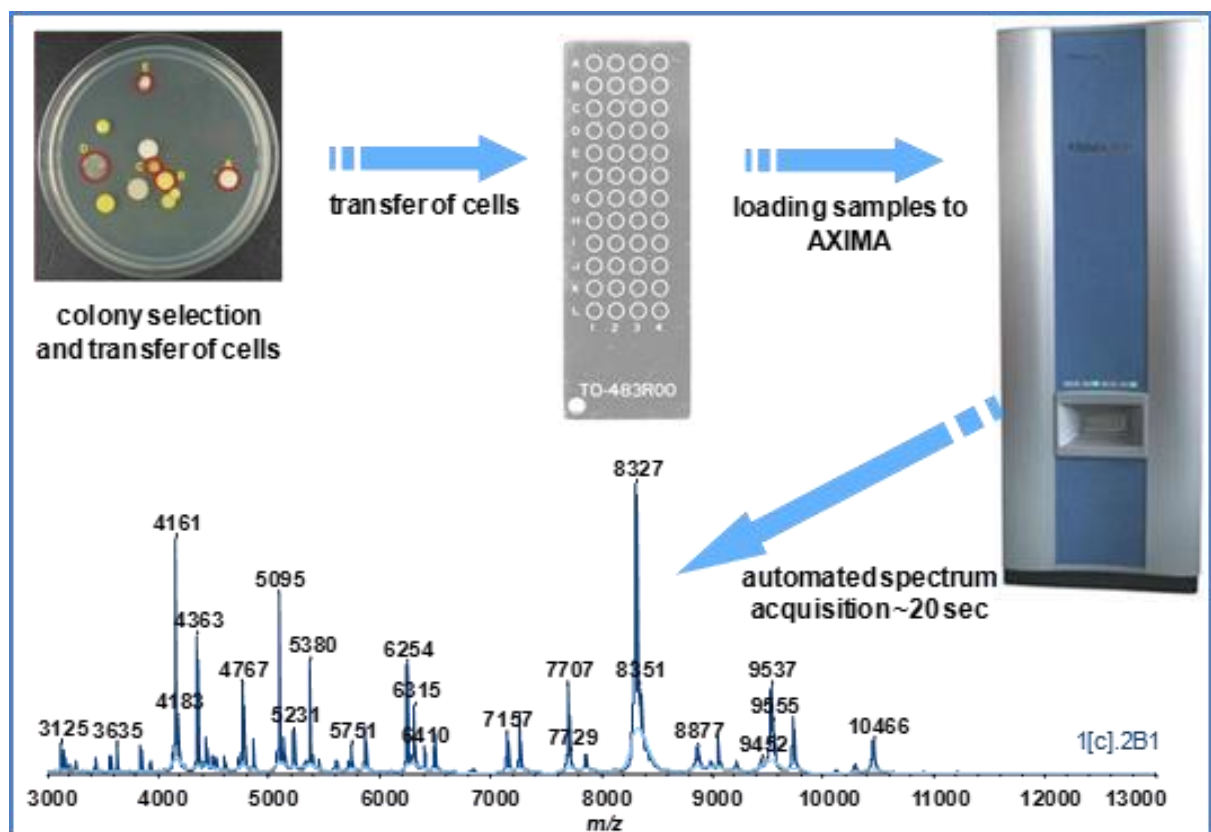
MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight) како дијагностичка алатка почнува интензивно да се применува од 1980 год. и првичната примена била во хуманата медицина, но последниве години со ист интензитет се користи и во ветеринарната медицина (121). MALDI-TOF MS во својата анализа ги користи структурните рибозомални протеини специфични за секој вид М/О, кои не се под значително влијание на условите на животната средина или растот (121, 122). SARAMIS™ претставува софтвер/база на податоци (data base) за автоматска идентификација на микроорганизми врз основа на нивниот спектар добиен со MALDI-TOF MS. Оваа база на податоци содржи спектри на патогени М/О (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 што 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 широк спектар 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]. Мао-Cheng G. et al. [123] во своето истражување констатирал дека со примена 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. Во истражувањето на Emily S. et al. [125] правеле споредување на четири различни дијагностички методи: ARIS (Automated Reading and Incubation System 2x System), API (Analytical Profile Index), MALDI-TOF MS и 16S ribosomal RNA. 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.

Постапката започнува со селектирање на колониите и нивен пренос на MALDI таргет. Таму клетките се имобилизираат со додавање на 1 μ l матрикс (40 mg/ml α -Суано-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 $m/z=2.000-20.000$. По обработката на спектрите, тие се внесуваат во SARAMIS софтверот каде идентификацијата на непознатиот изолат се вршеше врз основа на споредба на неговиот спектар со спектрите на познати микроорганизми од базата на податоци (Слика1).

Слика 1. Шематски приказ на идентификација на бактерии со користење 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 сирово млеко при ФВМС, каде до постапката на нивното испитување беа чувани на +4°C. Пред да се започне броењето на соматските клетки, примероците беа загреани на температура од +40°C и во рок од 15 минути беа анализирани со 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*.

4.3.4 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 групи беше да се комбинираат сите можни комбинации од БСК и микробиолошкиот наод по четвртина со цел да може да ја утврдиме интегрираност и валидност на овие две дијагностички методи во правилно идентификување четвртината како позитивна или негативна на СМ. Во однос на БСК, четвртината беше прогласена за позитивна ако на два од трите испитани примероци, БСК беше >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 и позитивен микробиолошки наод
2. Група **B** : <200.000 кл./мл и негативен микробиолошки наод
3. Група **N** : <200.000 кл./мл и позитивен микробиолошки наод
4. Група **M** : >200.000 кл./мл и негативен микробиолошки наод

За позитивни на СМ ги прогласувавме кравите кои и на една четвртина ќе го имаат исполнето еден од зададените критериуми т.е V, N и M.

4.4 Оценување на хигиенската оценка на различни области од телото на кравите

Оценувањето на хигиената на телото и оценување на хиперкератозата на боските беа изведени 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 тарзалниот зглоб (6). Истражувачите користат различни класификации при давање на хигиенската оценка на телото. Во ова истражување беа следени препораките на Schreiner D. A. et al. [95] и Sant'Anna A. C. et al. [96], односно беше користен четиристепен систем за оценување на хигиената на телото:

- 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 од нечистотија
- 4:** целата област е покриена со слој од нечистотија.

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

4.5 Утврдување на степенот на хиперкератоза на каналот од боската

Оценување на степенот на хиперкератозата беше изведено на секоја четвртина, пред самиот акт на молзење. Четвртините што беа пресушени не беа оценувани. Користевме четиристепен систем на оценување според препораките од Marcela de Pinho Manzi et al. [119] и Sandrucci A. et al. [120]:

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 кои проминараат 1-3мм од отворот на боската;
4. **(VR)**: многу груб прстен со кератин кој проминара повеќе од 4мм од отворот на боската.

4.6 Утврдување на антимицробната отпорност на причинителите што се најмногу распространети во различни фарми

Антимицробна отпорност беше направена на четири различни причинители на СМ, и тоа: *Staphylococcus aureus*, *Escherihia coli*, *Streptococcus agalactiae* и *Streptococcus uberis*. Изборот на изолати од 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, а доколку имаше инфицирани повеќе од една четвртина, тогаш по случаен избор беше одбран само еден изолат кој претставуваше репрезент на ниво на крава. Вкупно беа испитани 70 изолати, од кои: 24 изолати на *S. aureus* кои потекнуваат од 12 фарми, 6 изолати на *E. coli* кои потекнуваат од 4 фарми, 12 изолати на *S. agalactiae* кои потекнуваат од 2 фарми и 28 изолати на *Streptococcus uberis* од 11 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 што предизвикуваат маститис кај кравите, на десет антибиотици во различни концентрации: *Ampicilin* (AMP) (0.12-8µg), *Penicilin* (PEN) (0.12-8µg), *Erytromycin* (ERY) (0.25-4µg), *Oxacilin*

+2% NaCl (OXA+) (2-4 μ g), *Pirlamycin* (PIRL) (0.5-4 μ g), *Penicilin/Novobiocin* (P/N) (1/2-8/16 μ g), *Tetracycline* (TET) (1-8 μ g), *Cephalothin* (CEP) (2-16 μ g), *Ceftiofur* (XNL) (0.5-4 μ g) и *Sulphadimethoxine* (SDM) (32-256 μ g).

Процедурата беше изведена по препораките од производителот. Накратко, 3-5 колонии од чиста култура беа суспензирани во стерилна дестилирана вода до постигнување на густина од 0.5 McFarland, мерена со помош на дензитометар. По направената суспензија 30 μ l од истата се суспензираше во Mueller-Hinton бујон (Oxoid). Од вака направената суспензија по 50 μ l беа инокулирани во секое базенче од плочата, каде претходно од самиот производител се означени локациите и концентрациите на десетте користени антибиотици. Според комерцијалниот формат на плочата, на една плоча може да се нанесат по два изолати. Од позитивната контрола од плочата се инокулираше по 10 μ l на 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 инкубацијата плочите беа мануелно читани за присуство на раст на колонии во инокулираните базенчиња и беше одредена минималната инхибиторна концентрација (МИК) 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 испитани четвртини, испитани крави/млечни жлезди и на фарми вклучени во студијата. Дескриптивната статистика беше претставена преку апсолутни вредности на податоците и 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), проследен 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 одделни анализи и да се извлечат заклучоци. На тој начин беше направен преглед на просечниот БСК за сите изолирани причинители на ниво на четвртина и преку дескриптивна статистика беше 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 коишто во студијата беа дескриптивно прикажани.

Разликите меѓу 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 меѓу себе со цел да се утврди дали некоја од овие бактерии има повисок афинитет кон одредена четвртина од млечната жлезда; **3)** улогата на оштетеноста на боските во присуството на одредена бактерија преку споредба на застапеноста на сите изолирани видови бактерии меѓу 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 се употреби за да се утврди застапеноста на најчестите бактерии изолирани во различните четвртини од МЖ, поточно нивната доминација во одредена четвртина, како и да се утврди евентуалната значајна доминација на најбројните бактерии преку нивниот број на изолати во одделна 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 одредена 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 меѓу просечниот БСК со: **1)** различните класификациски групи на СМ; **2)** најчесто изолираните причинители; и **3)** чистотата на одделни 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 за позитивни додека 100 крави (26%) беа прогласени за негативни на СМ. 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.

Од севкупните анализирани изолати, до ниво на вид беа идентификувани 50 различни видови бактерии, односно 458 изолати (86,58% од изолатите), до ниво на род беа идентификувани 6 изолати (1,13% од изолатите) кој потекнуваа од два различни рода (*Streptococcus spp.* и *Corynebacterium spp.*), а неидентификувани 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
<i>CoNS</i>	123	23.25
<i>Streptococcus uberis</i>	83	15.69
Неидентификувани	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 urinaeequi</i>	5	0.95
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	5	0.95
<i>Corynebacterium spp.</i>	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
<i>Micrococcus luteus</i>	2	0.38
<i>Streptococcus bovis/equinus</i>	2	0.38
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	2	0.38
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	0.19
<i>Citrobacter braakii</i>	1	0.19
<i>Corynebacterium mucifaciens</i>	1	0.19
<i>Corynebacterium stationis</i>	1	0.19
<i>Corynebacterium striatum</i>	1	0.19
<i>Enterococcus pseudoavium</i>	1	0.19
<i>Enterococcus avium</i>	1	0.19
<i>Enterococcus avium/raffinosis</i>	1	0.19
<i>Enterococcus faecium</i>	1	0.19
<i>Globicatella sanguinis</i>	1	0.19
<i>Jeotgalicoccus marinus</i>	1	0.19
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1	0.19
<i>Micrococcus lylae</i>	1	0.19
<i>Micrococcus tereus</i>	1	0.19
<i>Parvibaculum lavamentivorans</i>	1	0.19
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	0.19
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1	0.19
<i>Rothia nasimurium</i>	1	0.19
<i>Rothia kristinae</i>	1	0.19
<i>Serratia marcescens</i>	1	0.19
<i>Streptococcus gallolyticus/macedonicus</i>	1	0.19
<i>Streptococcus ictaluri</i>	1	0.19
<i>Streptococcus parauberis</i>	1	0.19
<i>Streptococcus spp.</i>	1	0.19
<i>Streptococcus sanquinis</i>	1	0.19
<i>Streptococcus thoralensis</i>	1	0.19
<i>Weissella cibaria</i>	1	0.19
<i>Weissella paramesenteroides 2</i>	1	0.19
Вкупно:	529	100

Во Табела 3. прикажани се сите изолирани бактерии што беа идентификувани при изолацијата, каде 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 rostri</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 xylosum</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>Staphylococcus delphini</i>	1	0.83

Во **Табела 4.** се прикажани сите изолирани видови на *CoNS*, каде се идентификуваа 17 различни видови, од кои 15 беа во чиста култура, додека во 10 четвртини се изолирани по два причинители, при што во 3 случаи и двата изолати се од групата *CoNS*, додека во останатите 7 четвртини се мешана инфекција.

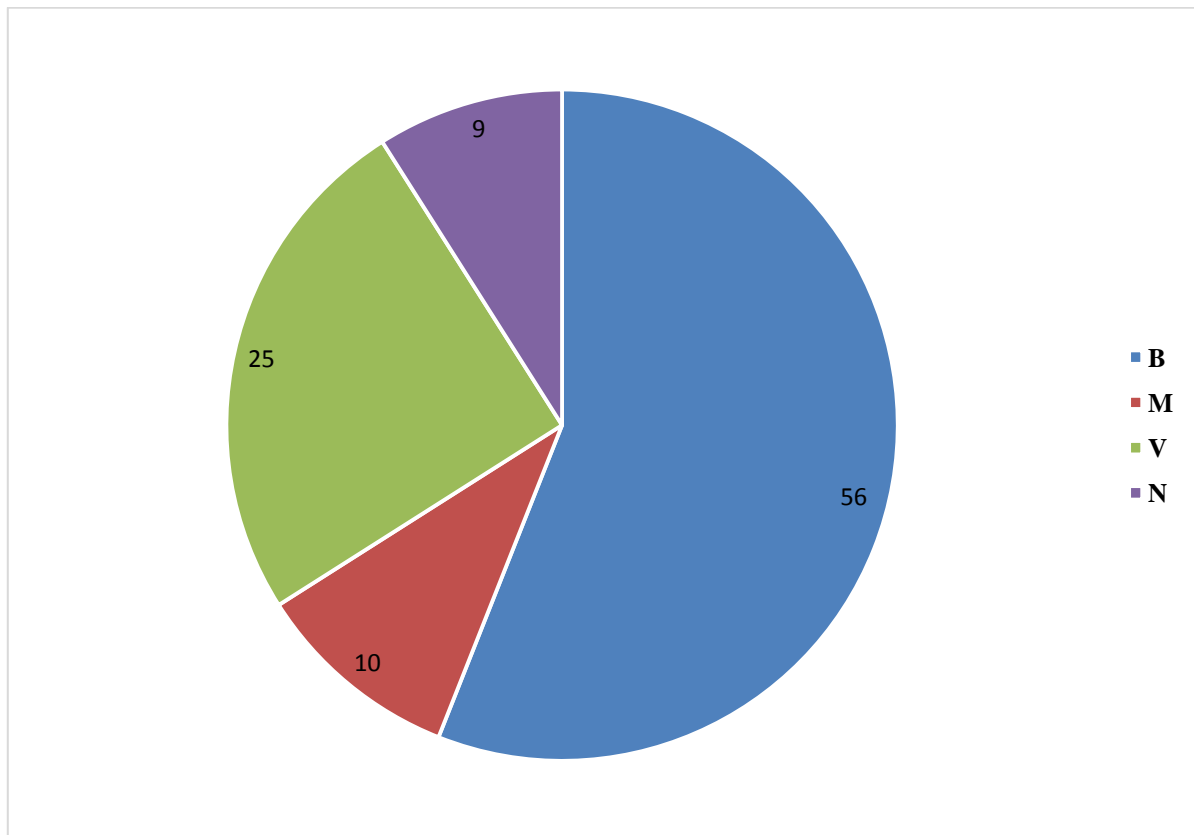
Просечниот БСК од сите испитани крави во студијата изнесуваше $603 \times 10^3 \pm 980 \times 10^3$, движејќи се во опсег од 8 до 8.908×10^3 кл/мл прикажан во Табела 5.

Табела 5. Просек на БСК.

БСК ВО МЛЕКО								
	Valid N	mean.	min.	max.	Lower Quartile	Upper Quartile	Std.Dev.	Standard Error
Бск Крава	384	603005	8667	8908834	83416	716263	980192	50020.2
Бск/пд	373	507733	7666	7655000	41666	400666	1073467	55582.0
Бск/пл	373	625758	1666	34358000	42666	381000	2109930	109248.0
Бск/зд	369	563860	3066	10374333	35000	449666	1183614	61616.5
Бск/зл	375	675717	5000	28466000	46333	497666	1930886	99710.5

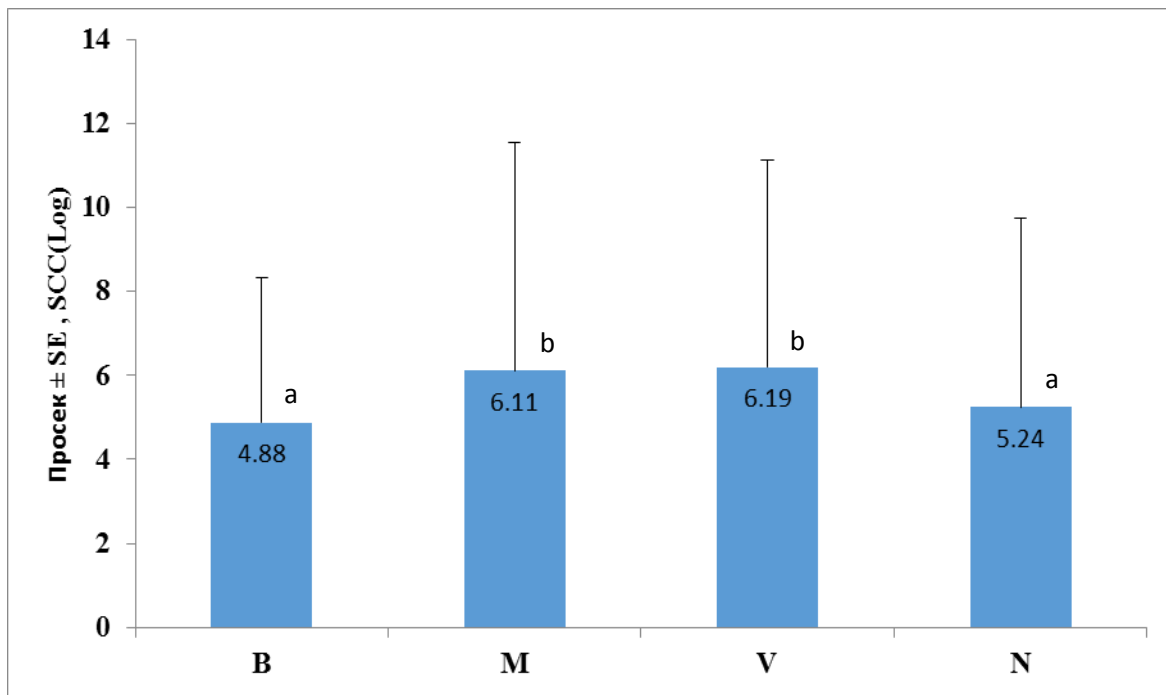
Во табела 5 е прикажан обзегот на БСК на ниво на секоја четвртина посебно и на ниво на крава од трикратното анализирани примероци на млеко.

Графикон бр. 1: Процент од испитани четвртини ($n=1.490$), класифицирани според микробиолошкиот наод и БСК: **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.



Графикон 1.

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 меѓу групите укажуваат на значајни разлики во БСК меѓу групите, $p < 0.001$.



Графикон бр. 2

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

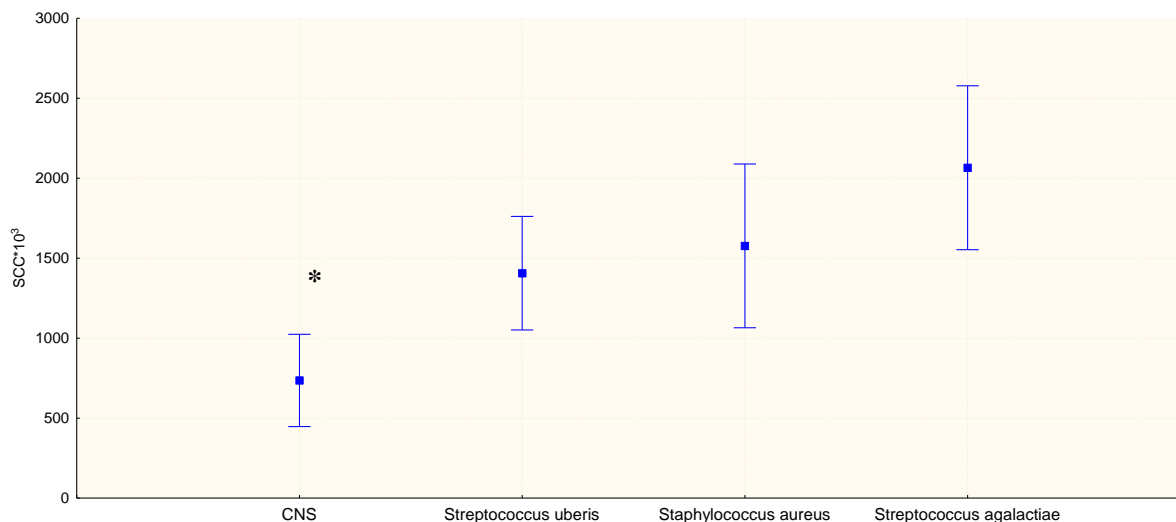
Табела 6. БСК $\times 10^3$ во четвртините од каде се изолирани бактерии

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

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

Во Табела 6. прикажан е БСК во четвртините од каде што беше изолиран одреден причинител/бактерија. Минималниот просечен БСК каде беше изолиран причинител изнесуваше 15×10^3 кл/мл кај *Aerococcus urogenitalis*, а максималниот изнесува 10.374×10^3 кл/мл кај *Streptococcus agalactiae*. Кај 13 изолирани причинители (20%) од вкупно изолираните 65 имале минимален просечен број на БСК $< 200 \times 10^3$, од кои, пак, 5 беа коинфекции, а од 8 беше изолиран само по еден причинител, додека 31 изолат со изолирани причинители (47,69%) имаа наод на БСК $< 200 \times 10^3$. Кај најчесто изолираните бактерии просечниот БСК значително беше понизок кај CoNS (735 ± 146) во однос на другите најчести бактерии од $1.406 - 2.065 \times 10^3$, F (3, 271) = 8.15, p < 0.001,

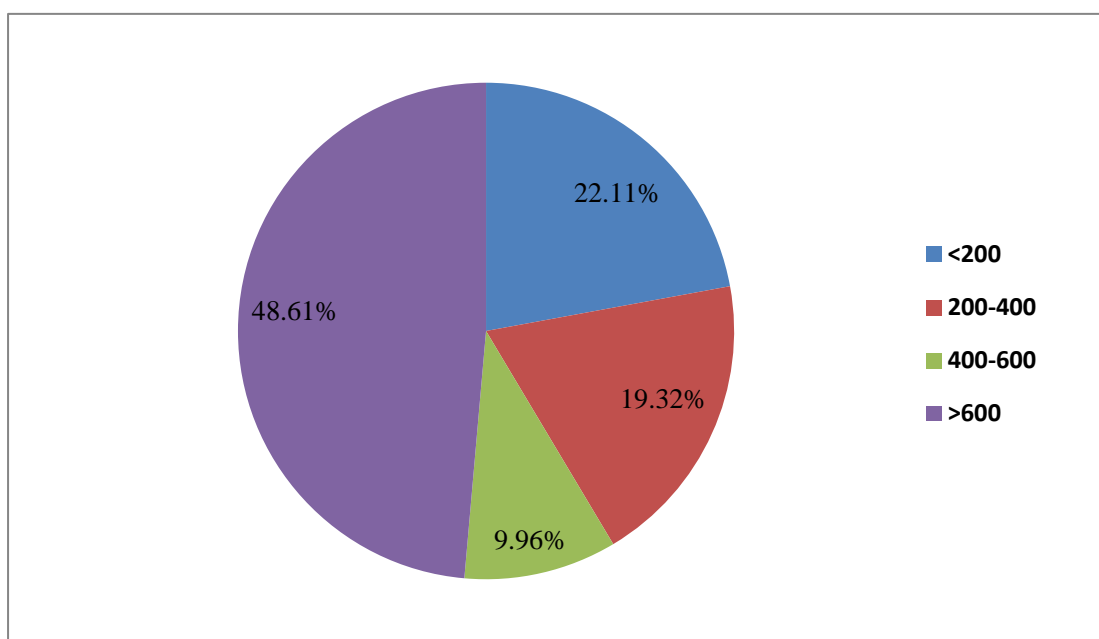
Графикон бр. 3 БСК (Просек \pm CI95) во четвртините каде што се изолирани најчестите бактерии во студијата * $p < 0.001$



Графикон бр. 3

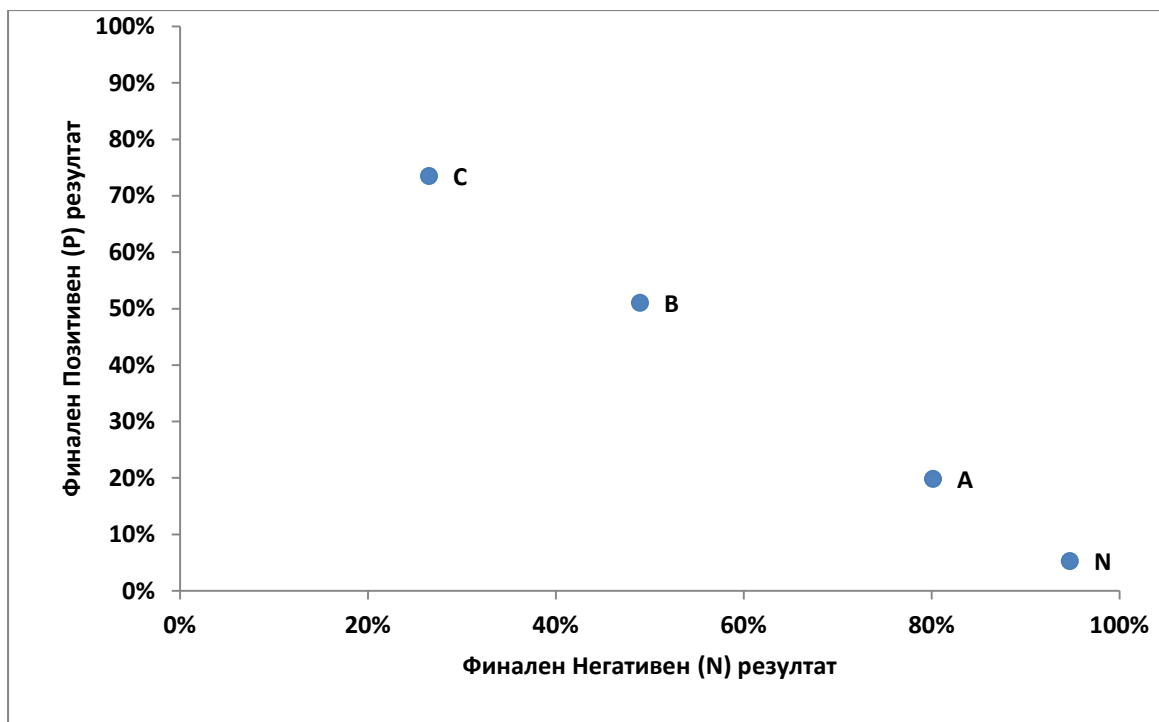
Во четвртините каде што имаше утврден микробиолошки наод, БСК се движеше од 15×10^3 до 10.374×10^3 со просечна вредност на БСК од $1.975 \times 10^3 \pm 1.573 \times 10^3$.

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

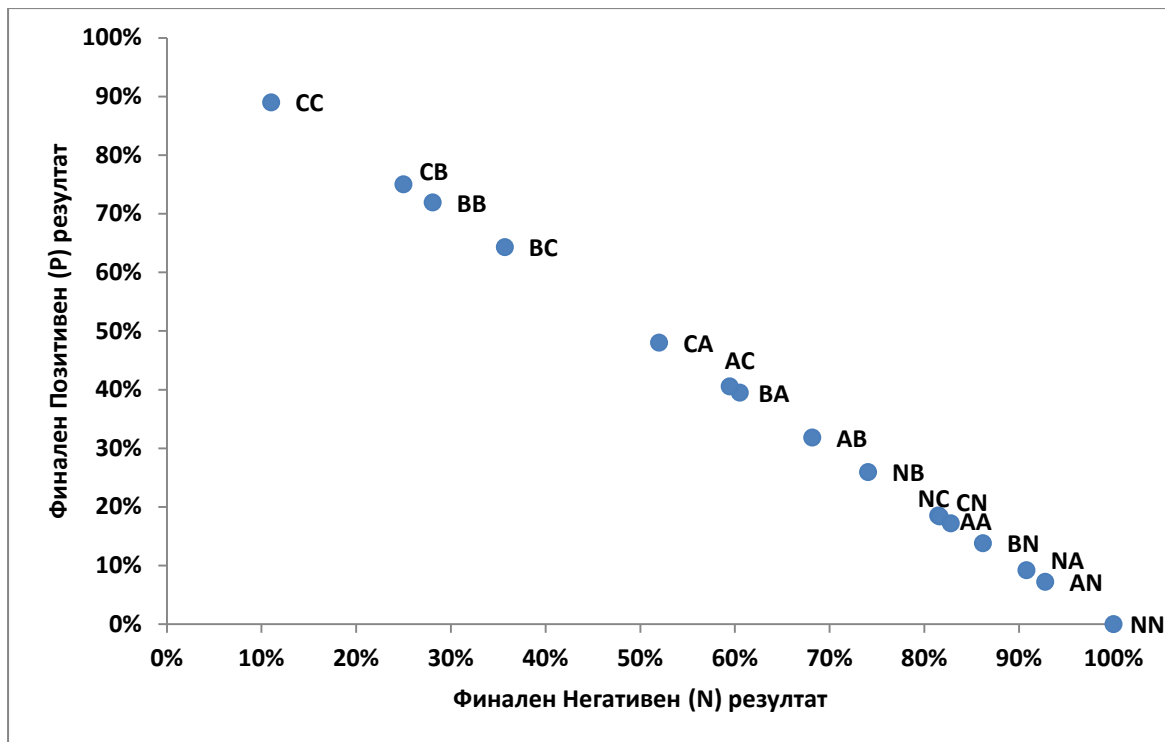


На **Графикон бр. 4** прикажана е процентуална застапеност на четвртините од сите четвртини со микробиолошки наод во однос на вкупниот БСК (прикажани како $\text{БСК} \times 10^3$).

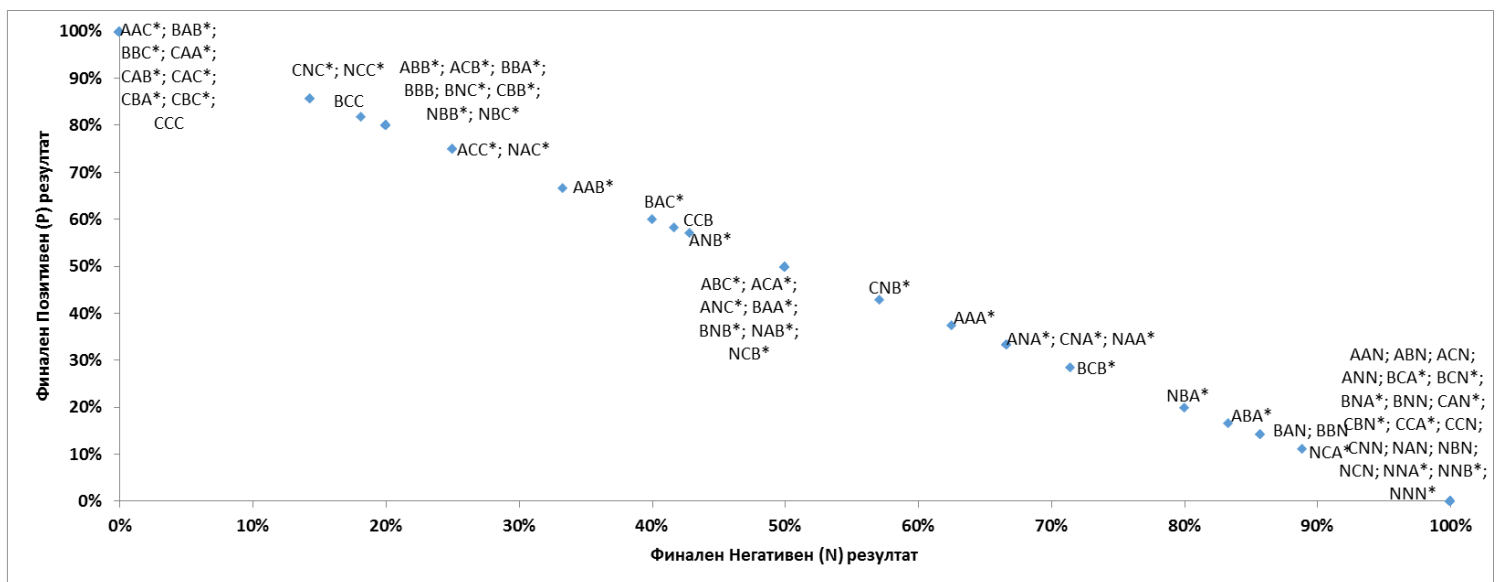
Во однос на бројот на земени примероци и споредба со финалниот микробиолошки статус на четвртината беше утвредно дека со само еднаш земени примероци, 95% од примероците што се прогласени како **N** (негативен наод) се исто така класифицирани како **N** и во финалниот микробиолошки наод (по три мострирања). Од друга страна 74% од примероците што при првото тестирање беа класифицирани како **C** ($>50 \text{ CFU}$) беа истотака 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: 5А, 5Б и 5В**.



Графикон бр. 5А



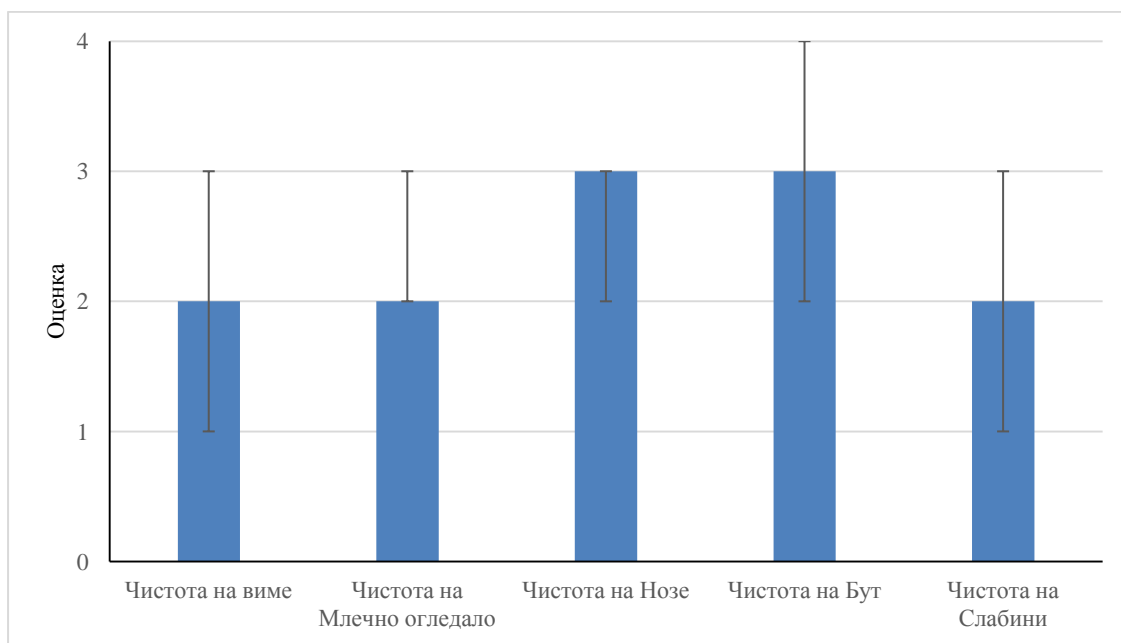
Графикон бр. 5Б



Графикон бр. 5В

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 области од телото кај испитуваните крави (n=384, медијана и 25-75 интерквартален опсег).

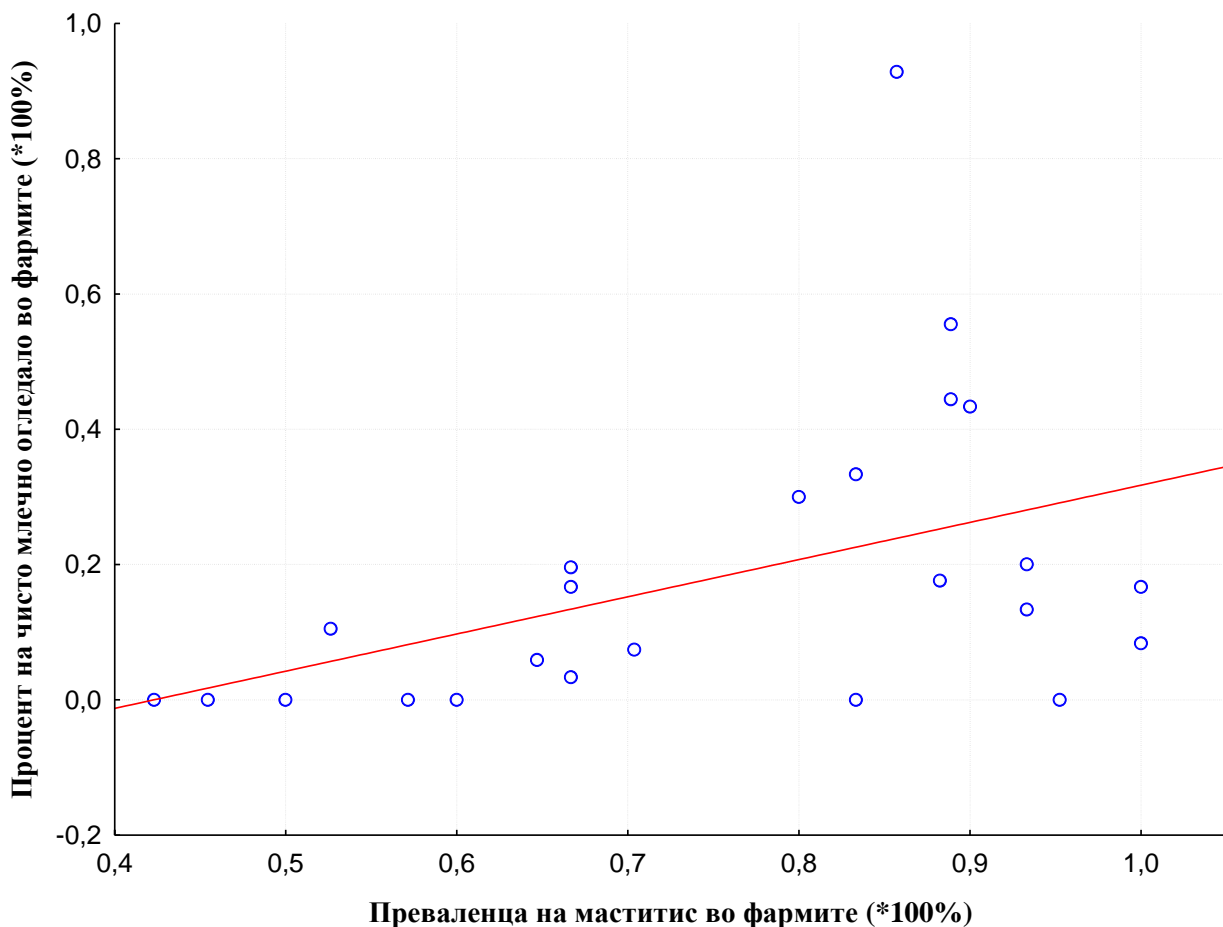


Графикон бр. 6

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 чистотата 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. 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 0-100% од кравите со чиста МЖ и слабина, до 93% од кравите со чисто млечно огледало, до 36% со чисти бутони и до 33% од кравите во фармите со чисти нозе. Во овој случај при спроведената Spearman Rank корелација се утврди значајна позитивна корелација меѓу процентот на крави со чисто млечно огледало на фармата наспроти застапеноста на СМ, Spearman $R = 0.50$, $p < 0.05$ (Графикон бр. 7).

Графикон бр. 7. Корелација помеѓу застапеноста на СМ во испитуваните фарми и процентот на крави со чисто млечно огледало, $R = 0.50$, $p < 0.05$



Графикон бр. 7.

Бројот на соматски клетки во четвртините класифицирани според степенот на чистота на одделни области од телото е прикажан во **Табела бр. 7**. При споредбите меѓу 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.

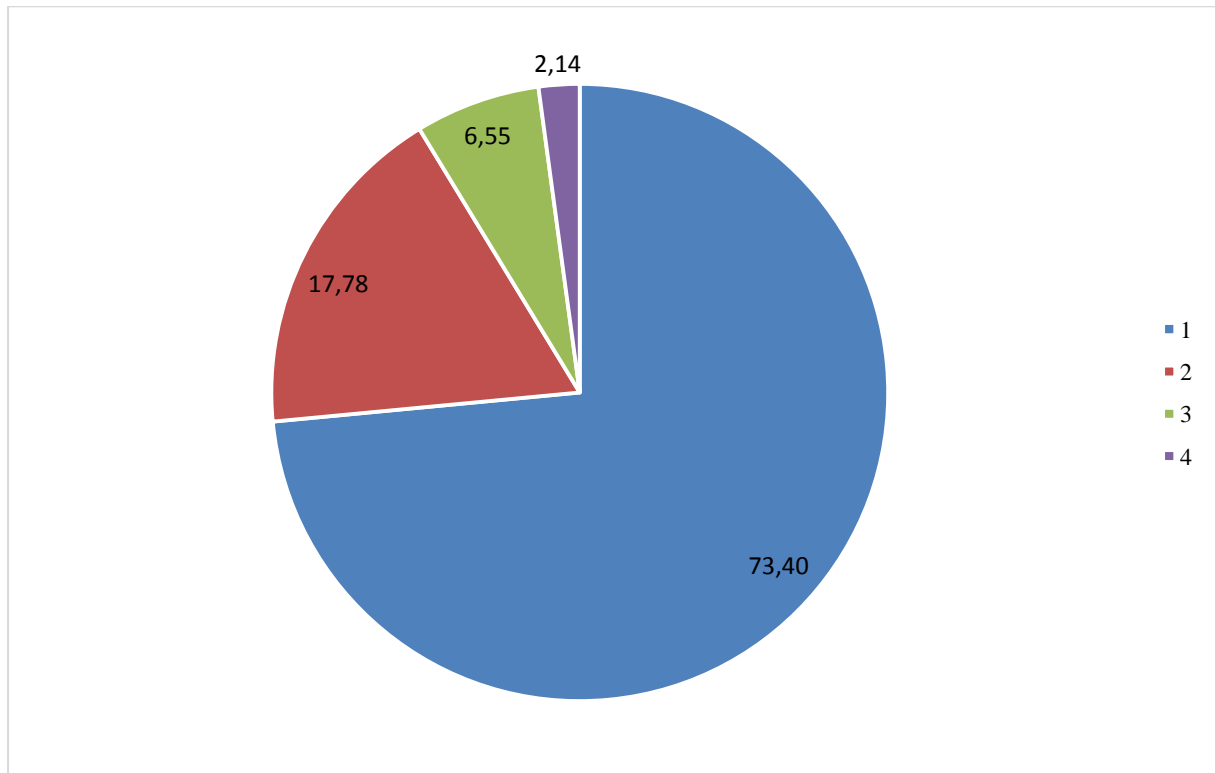
Табела 7. Просечен број соматски клетки ($\text{БСК} \times 10^3$) \pm SD кај кравите групирани според степенот на чистота на одредени партии на телото

Табела 7.

Регија		Степен на чистота			
		1	2	3	4
Виме		569 \pm 709	599 \pm 1199	726 \pm 1317	581 \pm 678
Млечно огледало		616 \pm 695	653 \pm 1165	515 \pm 735	617 \pm 1135
Нозе	547 \pm 546	591 \pm 1074	508 \pm 666	856\pm1348	
Бут	945 \pm 722	532 \pm 701	461 \pm 563	670 \pm 1227	
Слабини	625 \pm 766	498 \pm 862	781 \pm 1555	554 \pm 624	

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

Графикон бр. 8. 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 интеркватилен (25-75) опсег 1-2.

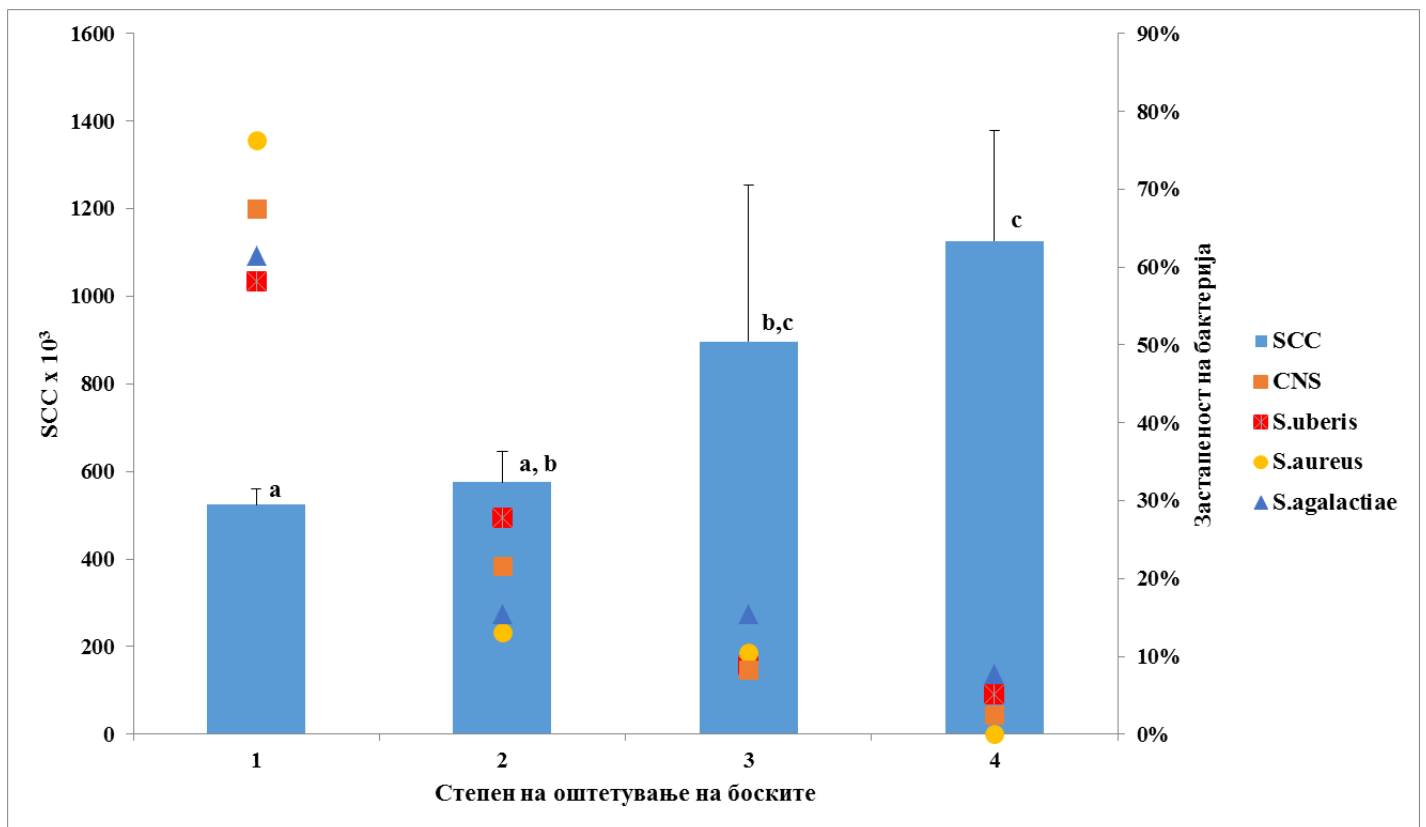


Графикон бр. 8.

Според степенот на оштетување, бројот на боски изнесуваше 1097 калсифицирани со 1 (без оштетување), 266 со степен на оштетување 2, 98 боски со трет степен и 32 боски со четврт степен на оштетување.

Утврдена е значителна разлика во БСК меѓу различно оштетените боски $H(3, N=1493) = 24.16, p < 0.001$. Притоа се утврди разлика на БСК меѓу оштетувањата од прв и втор степен во однос на БСК во боските од четврт степен, како и меѓу прв и трет степен (**Графикон бр. 9**).

Графикон бр. 9. БСКx10³ (просечен број ± SE) во четвртините според степенот на нивно оштетување (1-4) десна ордината. Различните букви означуваат разлики во БСК меѓу различните степени на оштетување, $p < 0.05$. Процентуална застапеност на најчестите изолирани бактерии во студијата кај различните оштетувања на боските, лева ордината.



Графикон бр. 9.

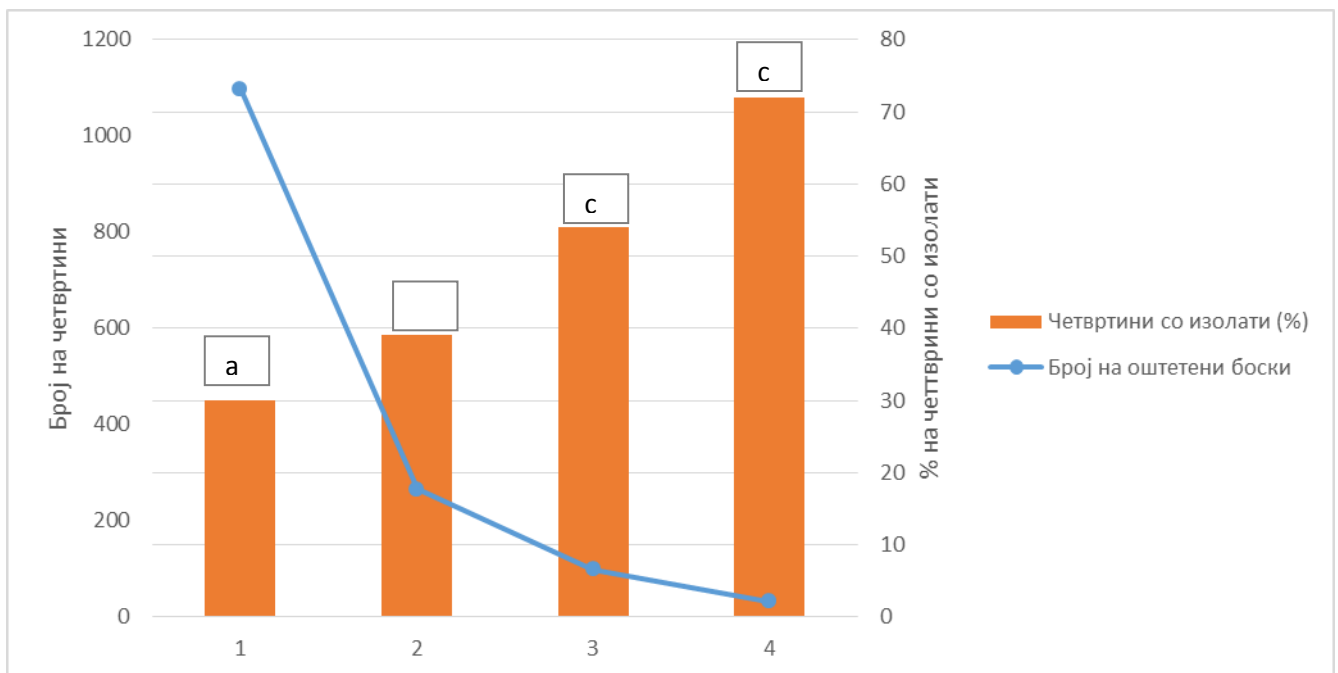
Бројот на четвртини според степенот на оштетување е прикажан во **Графикон бр. 9**. Во истиот графикон е прикажан и процентот на четвртини со бактериски изолати во однос на секоја категорија на оштетени боски.

Се утврди дека не постои значајна разлика меѓу 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 меѓу овие бактерии кај различните оштетувања на боските χ^2 (9, N=276)= 10.52, p=0.31 (**Графикон бр. 9**).

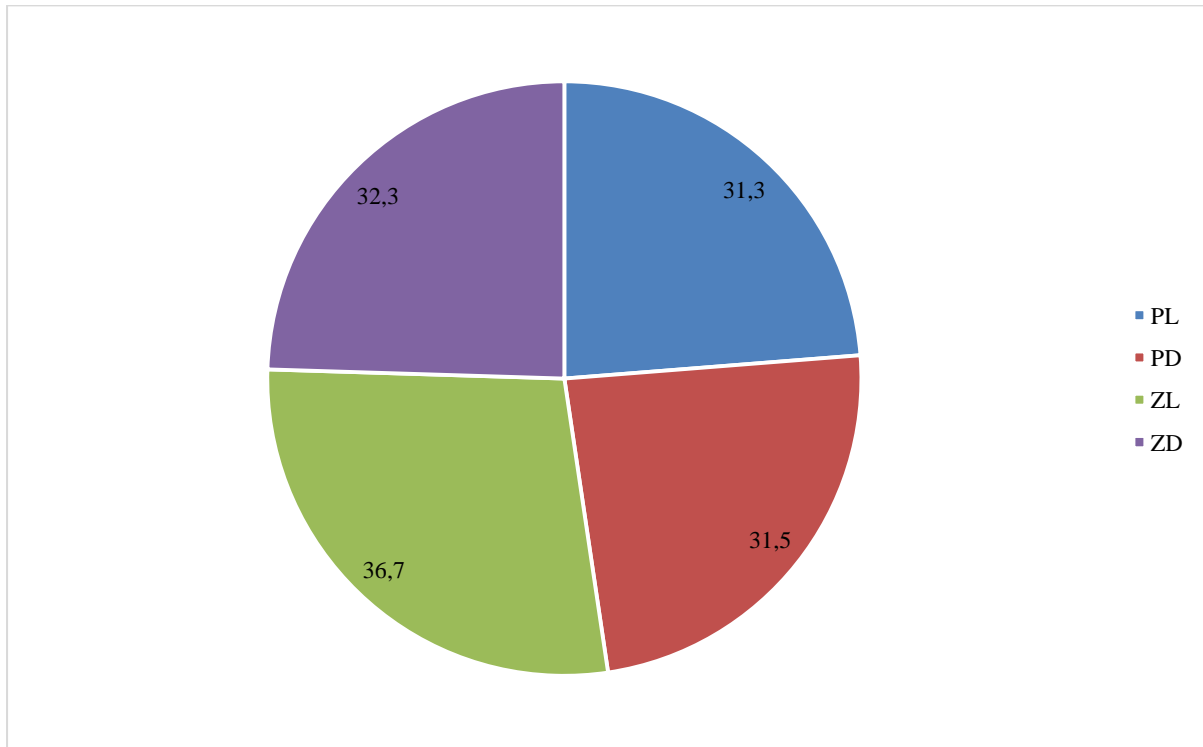
Графикон бр. 10. Приказ на вкупниот број оштетени боски по категорија (сина линија, 1-4) и процент на четвртини со изолиран причинител (столпчиња во проценти). Различните букви означуваат статистички значајна разлика помеѓу групите.

Графикон бр. 10.



Бројот на четвртини според степенот на оштетување е прикажан во **Графикон бр. 10**. Во истиот графикон е прикажан и процентот на четвртини со бактериски изолати по однос на секоја категорија оштетени боски.

Графикон бр. 11. Процент на четвртини со микробиолошки изолати од вкупно испитаните PL= предна лева, PD = предна десна, ZL = задна лева и ZD = задна десна четвртина.



Графикон бр. 11.

Во однос на утврдување одредена поврзаност меѓу 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, $\chi^2(9, N=1490)=5,65, p=0,77$.

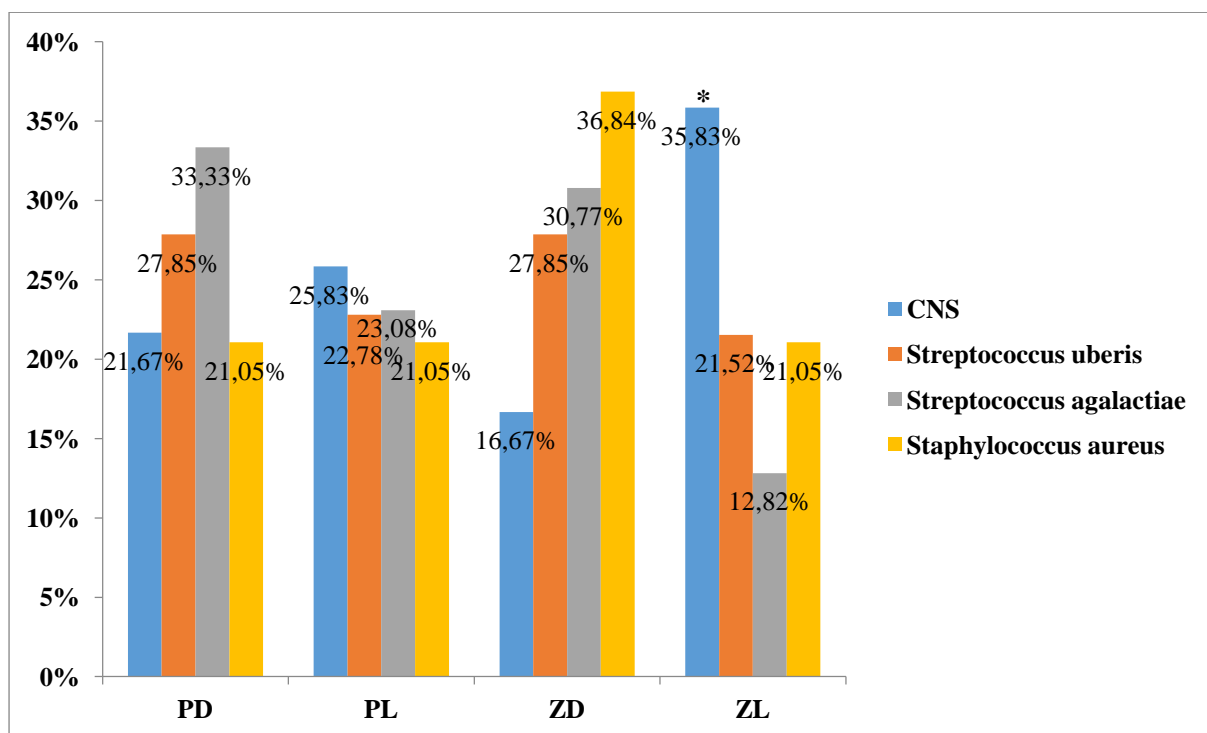
Табела 8. Детален приказ на бројот на четвртини според СМ класификација и нивната локација.

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 8. прикажан е бројот на четвртини според СМ статусот **В**= БСК $<200 \times 10^3$ и без наод на бактериолошки изолиран причинител; **Н**= БСК $<200 \times 10^3$ и бактериолошки изолиран причинител; **М**= БСК $>200 \times 10^3$ и без наод на бактериолошки изолиран причинител; и **В** =БСК $>200 \times 10^3$ 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 одредена бактерија за одредена четвртина од МЖ. Притоа се утврди дека не постои статистички значајна разлика меѓу бројот на изолати во секоја четвртина $H(3, N=264) = 1,85, p=0,61$. (Графикон бр. 12). Дополнително, и при отстранување на коинфекциите, повторно не се утврди значителна разлика помеѓу четвртините $H(3, N=184) = 0,48, p=0,92$.

Графикон бр. 12. Процентуална застапеност на најчесто изолираните бактерии во четирите четвртини (PL= предна лева, PD = предна десна, ZL = задна лева и ZD = задна десна четвртина).



Графикон бр. 12.

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

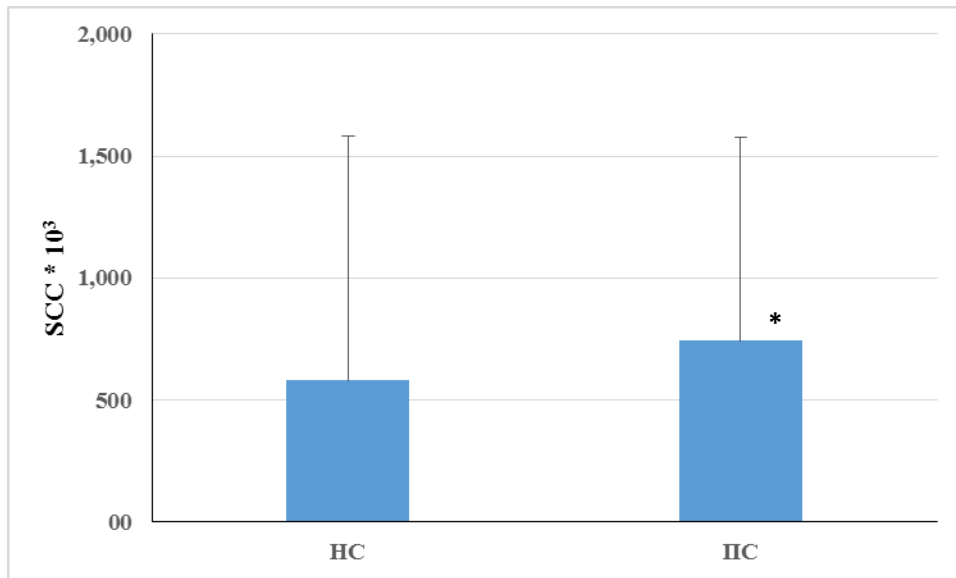
Bakterii	PD	PL	ZD	ZL	Row
CoNS	26	31	20	43	120
Streptococcus uberis	22	18	22	17	79
Staphylococcus aureus	8	8	14	8	38
Streptococcus agalactiae	13	9	12	5	39
All Grps	69	66	68	73	276

*значително повисока е вредноста на прилагодени резидуали $z=3.10$, $p<0.05$ во однос на застапеноста на анализираните четири најчести бактерии.

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

При споредбата меѓу застапеноста на најчестите бактерии изолирани во различните четвртини од МЖ, поточно нивната доминација во одредена 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 изолати на *CoNS* во ZL ($z=3.10$) во споредба со сите останати три бактерии и четвртини. (Табела бр.9).

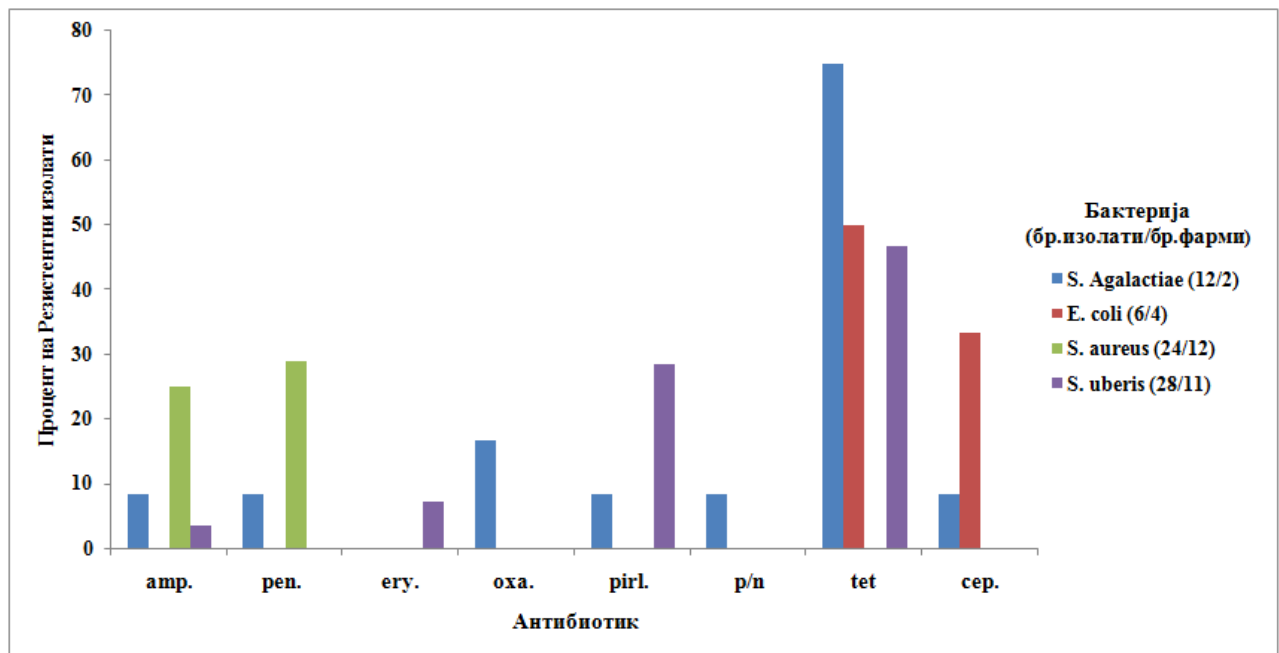
Графикон бр. 13. Просечен БСК \pm SD ($\times 10^3$) на кравите со МЖ под скочниот зглоб (ПС) и кравите со МЖ над скочниот зглоб (НС).* = $p < 0.05$.



Графикон бр. 13.

Се утврди дека кравите чија МЖ е под скочниот зглоб имаат значително повисок БСК во млекото (Mdn=456x10³) наспроти оние со МЖ над скочниот зглоб (Mdn=225 x 10³), U=7014, p=0.012. **Графикон бр. 13.**

Графикон бр. 14. Ја прикажува АМО на најфреквентните причинители на СМ во однос на најчесто употребуваните антимикуробни лекови во млечната индустрија.



Графикон бр. 14. *Ampicilin* (AMP) (0.12-8 μ g), *Penicilin* (PEN) (0.12-8 μ g), *Erythromycin* (ERY) (0.25-4 μ g), *Oxacilin +2% NaCl* (OXA+) (2-4 μ g), *Pirlamycin* (PIRL) (0.5-4 μ g), *Penicilin/Novobiocin* (P/N) (1/2-8/16 μ g), *Tetracycline* (TET) (1-8 μ g), *Cephalothin* (CEP) (2-16 μ g), *Ceftiofur* (XNL) (0.5-4 μ g) и *Sulphadimethoxine* (SDM) (32-256 μ g).

Највисок степен на отпорност утврдивме кај *S. agalactiae* на tetracycline (75%), на истиот антибиотик со понизок процент на отпорност беше утврден и кај *S. uberis* (46%), којшто покажа отпорност и на ampicillin (3.5%), erythromycin (7%), pirlmycin (29%). Антимикробната отпорност кај *S. aureus* беше утврдена на два антимикуробни лекови одн. на ampicillin (25%) и penicillin (29%). Од 6 испитани изолати на *E.coli* 3 изолати беа отпорни на tetracycline додека 2 беа отпорни cephalothin, каде еден изолат беше отпорен и на двата антимикуробни лека.

6. ДИСКУСИЈА

Во последниве децении фокусот на млечната индустрија е насочен кон добивање висококвалитетно млеко, зголемување на хигиената на фармите и пронаоѓање 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 територијата на Република Северна Македонија. Да се установи методолошката постапка којашто е оптимална за дијагностицирање на СМ, да се одреди нивото на хигиената на фармите и дали хигиената и хиперкератозата на боските претставуваат ризик-фактори при појавата на СМ, како и антимицробната отпорност на дел од причинителите на оваа болест.

Во нашето истражување застапеноста на СМ на ниво на крава беше 74%, додека застапеноста на ниво на четвртина беше 43%. Вака добиените резултати укажуваат на изразито висока застапеност на СМ во малите краварски фарми во РСМ, каде речиси секоја четврта крава е здрава. Добиените резултати 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, одгледувањето на млечни говеда првенствено е за основна егзистенција. Застапеноста на СМ на ниво на крава и четвртина во Косово била 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 слични со нашите, во останатите земји застапеноста била далеку пониска. Исто така, 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 може да се толкуваме од два различни аспекта. Првично е тоа што во сите овие студии молзењето било на рака, со што може да се контролира дали сè уште има заостанато млеко во МЖ. Исто така, се работи за крави со ниска продукција на млеко

[29], каде дополнително по молзењето се пуштаат и телињата кои максимално го извлекуваат заостанатото млеко во МЖ [27]. Sanotharan N. et al. [29] пријавиле застапеноста на СМ од 32.5% и 89.7% кај кравите кои по молзењето биле цицани и нецицани од телињата последователно. Другата причина е во постапката на земање на мострите и кои критериуми 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), при што дополнително само од КМТ позитивните четвртини било земено млеко за бактериолошко испитување. Калифорнија маститис тестот дефинитивно е практичен, лесен за употреба и евтин дијагностички тест, но како метод е премногу субјективен [22, 128]. Ова укажува дека при оценувањето со КМТ добиениот резултат како слабо позитивен или негативен пред сè ќе зависи од искуство на оценувачот т.е. проценката е субјективна. На овој начин лесно може да биде погрешно класифицирана четвртината, а индиректно и самата крава. Според DoHoо I. T. et al. [18] од самите почетоци на примената на КМТ се укажува дека пресекот на КМТ е од 150.000 до 400.000 кл./мл, а слабо позитивниот примерок се карактеризира со 300.000 до 1.000.000 кл./мл. Исто така, еднократното земање млеко за КМТ може да даде погрешно толкување, бидејќи според Sharma N. et al. [23] флукуацијата на БСК во самата четвртина меѓу две молзења од иста крава може да варира 30-35%. Затоа во нашето истражување за позитивни четвртини врз основа на БСК беа прогласени само четвртините кои имаа >200.000 кл./мл на два од три земени примероци на млеко за БСК. Дополнително во наведените истражувања бактериолошки неиспитани остануваа четвртините што се КМТ негативни, што не значи дека се и 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 што би биле недијагностицирани, т.е. идентификувани како лажно негативни кога во истражувањето за бактериолошка анализа се земаат само КМТ позитивните четвртини. Во оваа група би припаѓале 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 контагиозните 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. [58] во своето истражување утврдиле дека просекот на БСК во четвртините инфицирани со *CoNS* бил 306.106

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

Во вториот споредуван систем припаѓаат фармите за производство на млеко во високоразвиените земји што имаат современ начин на одгледување на млечните говеда и применуваат соодветни хигиенски практики на МЖ. Таму се 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 говеда*) 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 на ниво на крава во Финска беше 31%, во Холандија 22%, а во Рагуза, Италија 49.4%, во Германија резултатите се пријавени само на ниво на четвртина и тој процент е 26%, 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 овие земји имаат за 2/3 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 >200.000 кл./мл, додека бактериолошка изолација е утврдена кај 33.5% од сите четвртини. Слично било и истражувањето во Холандија [130], каде прелиминарно од вкупниот број крави, 22% биле крави коишто имале >250.000 кл./мл и биле породени два или повеќепати и крави со БСК >150.000 кл./мл кои биле само еднаш породени. 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, т.е. во првото истражување (во Финска) бактериолошко култивирање е направено на сите четвртини, додека во истражувањето во Холандија бактериолошко култивирање е направено 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/ml. 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 до висок број лажно позитивни четвртини. Во споредба со резултатите добиени од Германија [114], каде застапеноста по четвртина била 22%, и Рагуза во Сицилија [131] каде застапеноста по крава била 49.4%, а 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 . Спротивно од ова, за истражувањето во Рагуза [131] користеле друг лимит, т.е. 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 посензитивен. Дополнително, високата застапеност на СМ кај нив се поврзува со користење 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, при 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 четвртина. Овој процент е добиен со пресметка на сите четвртини што 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, при што е неминовно последователно да имаат и повисок БСК, бидејќи станува збор за период каде кравите се речиси најподложни на 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, самите практики и начини на управување во фармите веројатно имаат и најголем удел во застапеноста на СМ. Но сепак, влијание на добиените резултати може да има и протоколот, т.е.

методологијата што се користела при истражувањето, особено кои вредности (критериуми) се применувале при прогласувањето на четвртината како позитивна или негативна на СМ. Со ова се согласни и Pitkälä A. et al. [129] кои наведуваат дека секогаш одредени крави ќе бидат дефинирани како лажно позитивни или лажно негативни.

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 во однос на БСК, а повисок процент на бактериолошки позитивни четвртини, најверојатно се должи на нашето трикратно земање мостри во однос на еднократното земање мостри. Со ова се согласни и Persson Y. et al. [21] кои укажуваат дека еднократното земање примероци има ниска сензитивност на наодот на инфицираните четвртини. Dzabri B. et al. [80] наведуваат дека сензитивноста за бактериолошка изолација на *S. aureus* при еднократно земање на мостри е 60%, додека со трикратно земање достигнува до 91%. НМС [118] укажуваат дека со примена на трикратно земање примерок млеко се подига сензитивноста која е способна да ги открие ИМИ, додека со подигање на специфичноста ќе се добие правилна идентификација на неинфицираните четвртини. Дополнително, со трикратно земање примероци на млеко се минимизира, т.е. воопшто немаме контаминирани примероци. Споредено со истражувањата каде применувале само еднократно земање млеко, процентот на контаминирани примероци бил: 13% Рона-Алпи Франција, 3.3% Танзанија и 3% во Швајцарија [30, 27, 133]. Дефинитивно, златен стандард во утврдување на СМ е изолација на соодветниот причинител. Иако трикратно земање млеко драстично го зголемува процентот на бактериолошка изолација по четвртина, но сепак не секогаш успеваме да го изолираме причинителот. Ова укажува дека ако се користи само бактериолошки наод, таквите четвртини или крави може да бидат прогласени за лажно негативни. Во нашето истражување од вкупно испитаните четвртини 35% беа со БСК >200.000 кл./мл, од кои 28% од нив беа без бактериолошки изолат. Resul K. et al. [78] во Турција детектирале застапеност на

СМ на ниво на четвртина со КМТ 16.14%, додека од нив бактериолошката изолација утврдиле само во 60.8%. Во истражувањето во Шведска [21], 1/5 од КМТ позитивните четвртини биле бактериолошки негативни, додека во Уругвај, Giannechini R. et al. [117] во истражувањето на застапеност на КМ и СМ бактериолошка изолација добиле во 32.5% од пробите што потекнувале од КМ, додека во четвртините со БСК > 300.000 кл./мл бактериолошка изолација добиле само во 45% од вкупните примероци млеко.

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

Освен наведените, постојат и други дополнителни фактори кои што можат да влијаат врз неуспешноста во изолација на причинителот:

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

- Околинските причинители на СМ, како *E. coli*, и дел од *CoNS* причинители се инфекции кои може да траат и 30 дена. Тие може да предизвикаат имунолошки одговор кој може да трае и кога ќе дојде до самоизлекување, т.е. и по елиминацијата причинителот [77].

- Некои хронично заразени четвртини спонтано ги елиминираат бактериите од млекото и така даваат лажно негативни примероци [80]. Dzabri B. et al. [80] 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.

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

- Дополнително на ниту една фарма каде што беше спроведено нашето истражување не се прават месечни контроли на БСК на ниво на крава и не се води млечен картон, т.е. не се знае кога последен пат имала и дали имала КМ. Фармите, т.е. кравите не се внесени во систем на следење на нивниот здравствен статус на МЖ, но и никогаш не се шартираат 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. [134] наведуваат дека колку оценката на КМТ е повисока толку веројатноста да се изолира причинителот е поголема. Иако скапо како постапка, сепак применетото трикратно земање примероци на ниво на четвртина, овозможува добивање на релевантни податоци. За да биде исправно земањето млеко за БСК на ниво на крава, треба да биде од канта откако ќе се измолзе целокупното млеко од кравата, додека на ниво на четвртина може и од неколку млаза, по отфрлање на првите 3-5 млаза [80]. Forsback L. et al. [87] 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. Оваа состојба се објаснува како последица на разредувањето, односно доколку другите четвртини се здрави и имаат низок БСК, инфицираната четвртина нема да се детектира.

Освен познавањето на застапеноста на СМ во нашите фарми, неминовно е да се знае и кои се неговите најчести причинители, бидејќи низ годините се менуваат и најчестите маститис патогени М/О. Тоа е дополнително важно бидејќи контролните програми на ниво на држава или фарма во намалување на застапеноста на СМ се темелат врз соодветниот причинител, како и врз познавање на неговите карактерни својства.

Во нашето истражување *CoNS* беа најчесто изолирани причинители на СМ со 23% од вкупните бактериолошки изолати. Во повеќето истражувања се наведени како униформна група и како такви се презентирани. Освен во нашето истражување, доминантност во изолацијата на *CoNS* пријавиле и Pitkälä A. et al. [129] со 50% во Финска, Toronen S. et al. [135] во Финска 45%, Persson Y. et al. [21] во Шведска 27%, додека пониска застапеност пријавиле Resul K. et al. [78] во Турција и Giannechini R. et al. [117] во Уругвај со по 20% и 7%. 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 утврдувањето дали тој е бактериолошки позитивен или не. За разлика од лимитот што е унифициран при прогласување дека четвртината е инфицирана со *S. aureus* и *S. agalactiae* [114, 118, 130], за потврдувањето на четвртините за инфицираност со *CoNS*, различни студии користеле различен лимит и тоа: Persson Y. et al. [21] >300 cfu/1ml, Pitkälä A. et al. [129] >500cfu/1ml, Tenhagen B. A. et al. [114] >1.000cfu/1ml или таргетирана ДНК на целни причинители со PCR анализа Taponen S. et al. [135].

Во нашето истражување утврдивме 17 различни видови на *CoNS*, од кои најзастапени беа: *S. haemolyticus*, *S. chromogenes*, *S. simulans* и *S. epidermidis*. Cervinkova D. et al. [136] идентификувале 19 видови на *CoNS*, од кои најдоминантни биле: *S. scuri*, *S. xylosum*, *S. arlettae* и *S. warneri*. Ndahetuye J. B. et al. [137] во Руанда утврдиле 12 видови, од кои најдоминантни биле: *S. epidermidis*, *S. scuri*, *S. chromogenes*, додека *S. xylosum* и *S. haemolyticus* биле со ист процент на застапеност, додека во истражувањето на Frey Y. et al. [138] во Швајцарија најдоминантни причинители биле: *S. xylosum*, *S. chromogenes*, *S. scuri* и *S. haemolyticus*. 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. Земајќи го во предвид 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 *S. haemolyticus* пред сè е од околината, простирката и МЖ [114, 137], *S. epidermidis* од кожата на молзачите каде некогаш пројавува и контагиозни својства [137], додека за *S. chromogenes* и *S. 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 предвид доминацијата на *CoNS* како група и поединечните 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 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 Tenhagenet. В. А. et al. [114] во Германија (3.7%), Taponen S. et al. [135] во Финска (8%), Sylejmani D. et al. [28] во Косово (6.2%) и Persson Y. et al. [21] во Шведска (14%), додека повисока застапеност пријавиле Resul K. et al. [78] во Турција (20%). Во нашето истражување горенаведениот причинител беше идентификуван во 62.5% од фармите (n=15), каде застапеноста во фармите се движеше 2-83%. Високата застапеност на овој агенс, како и широката дистрибуција на застапеноста во и меѓу фармите може да се должи на следниве причини:

- Во сите наши испитани фарми се користеше простирка којашто е од органско потекло (*слама или плевина*), што претставува идеално место за развој на околинскиот *Strep. uberis* [46, 48].

- Отсуството на хигиенски практики во македонските фарми и неприменување на антибиотското пресушување, што има силно влијание во застапеноста на овој причинител, имајќи предвид дека најголемиот број 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 реинфекции од истиот причинител [49, 139]. Ова укажува на долготрајна перзистенција на причинителот и негова повторна изолација и во следните лактации.

- Карактеристичната застапеност којашто 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. [18] во Турција (4%), додека повисока застапеност пријавиле: Cervinkova D. et al. [136] во Република Чешка (9%), Tenhagan B. A. et al. [114] во Германија (22%), Taronen S. et al. [135] Финска (26%). Исто така, застапеноста на *Strep. agalactiae* беше варијабилна во однос на нашето истражување. Така, Tenhagan B. A. et al. [114] во Германија пријавиле 2.7%, Pitkälä A. et al. [129] во Финска 0.1%, Cervinkova D. et al. [136] во Полска 0.7%, Persson Y. et al. [21] во Шведска 0.2%, додека со повисока застапеност од нашата пријавиле Sylejmani D. et al. [28] 14% во Косово.

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 дури најразвиените млечни индустрии. Пред сè, 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 фарми, односно 17% (n=4). Но, процентот на инфицирани крави беше поголем и се движеше 10-71%. Velez J. R. [70] 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 % во Принц Едвард.

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

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 сè 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. [140] првично е дизајниран да ја намали застапеноста и да го спречи ширењето на *Strep. agalactiae* во фармата. 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 по 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 по 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 [140]. Дополнително, високата застапеност на инфицираност со околинските маститис патогени М/И го инхибира растотот 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 утврди присуството на *Strep. agalactiae*, што понатаму директно е поврзано со инфицираната МЖ, што 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. [34] заклучуваат дека постои широк спектар соеви на *S. aureus* и дел од нив може да се однесуваат и како околински маститис патогени, како и дека повеќето стада имаат доминантен сој на фармата.

Особено е изразена разликата во нивното третирање и ерадикација од стадото. *Strep. agalactiae* и покрај својата висока контагиозност сè уште е осетлив на пеницилинските препарати и процентот на излекување се движи од 84-100% [70]. Спротивно од него, процентот на успешност при терапирањето кај *S. aureus* се движи 4-92% [33, 45]. Ваквата состојба, т.е. антибиотка резистентност кај *S. aureus* се должи на неговите својства, и тоа: **а).** продирање во ткивото на МЖ и формирање апсцеси и фиброзна обвивка околу себе, со што во променетото ткиво тешко се постигнува минимална инхибиторна концентрација на лекот; **б).** преживување во неутрофилите; **в).** интрацелуларно лоцирање во епителните клетки; **г).** развој преку формирање микро колонии или L-форми кои се дефицитни со клеточен сид; **д).** формирање биофилм и излучување ензим бета-лактамаза [35, 45, 69]. Zecconi A. et al. [33] навеле дека и со строга примена на Планот од пет точки во стадото првичните резултати во намалувањето на застапеноста на ИМИ предизвикана од *S. aureus* ќе се установи после 10 месеци.

Одговорот на *Strep. agalactiae* на антибиотската терапија е добар и каренцата е мала (краткотрајна), така што млекото е неупотребливо само 24ч. по третманот. Има економска исплатливост за лечење и во силно заразените стада, иако е утврдена негативна корелација меѓу БСК и исходот од терапијата, како и тоа дека 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 времетраењето на инфекцијата. Предните четвртини полесно се лекуваат од задните, а 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 тешко 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 причинителя, неопходна е примената на Планот од пет точки во стадата. Неговата задолжителната примена 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 антимикуробната отпорност, во последните години повторно се забележува зголемена застапеност на овој причинител во фармите [62]. Дополнително Mweu M. M. et al. [71] 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 сила, па затоа и во последниве години изолатите на *Strep. agalactiae* од СМ во Данска имаат човечко потекло.

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/И (69). Така, на пример, се препорачува воведување на следните мерки:

- Затворени стада, што подразбира ограничен влез на нови единки (69)
- Задолжително носење ракавици (69)
- Промена во редоследот на молзење:
 - Прво се молзат здравите крави, потоа
 - Крави со непознат статус,
 - Крави со висок БСК, и на крај
 - Крави со хронични ИМИ [38, 69].

Во другите слични истражувања со нашето, пониска застапеност на *Streptococcus dysgalactiae* било пријавено во Холандија, Полска, Германија и Република Чешка, каде процентуалната застапеност се движела 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. [142] наведуваат дека и по примената на сите контролни програми во Норвешка, *Streptococcus dysgalactiae* е втората најчесто изолирана бактерија по *Staphylococcus aureus* од СМ и КМ. Последните години тој процент се зголемува, а притоа причината сè уште 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 друга страна од својствата на самиот причинител. Во истражување од Полска мострите биле земено една недела пред самиот акт на пресушување [132], и притоа Calvino L. F. et al. [143] тврдат дека изолатите на *Streptococcus dysgalactiae* добро се размножуваат во млекото добиено во рана и доцна лактација. Во Холандија биле земено мостри само од 25% од кравите во фармата со висок и низок БСК, при што Sampson O. et al. [130] наведуваат дека *Streptococcus dysgalactiae* е почесто изолиран од кравите со низок БСК во однос на фармите со висок БСК во лактофризерот. Во Република Чешка земањето мостри било исто како и нашето, од сите клинички здрави МЖ и од сите крави што биле присутни на 16^{те} фарми вклучени во студијата [136], додека во Германија се земено мостри од 80 фарми, од секоја фарма по 32 крави по телење и пред самото пресушување [114]. Најверојатно таквиот низок процент на застапеност на *Streptococcus dysgalactiae* се должи на ригорозни правила и практики што се користат на фармите во Германија, каде, за разлика од кај нас, 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 што биле вклучени во истражувањето секогаш кравите со КМ биле преместени во болнички оддел. Во истражувањето во Шведска биле вклучени 226 фарми и од секоја фарма се земале мостри од две крави, и тоа една со висок БСК и друга која на последниот месечен тест за БСК за првпат имала >200.000 кл/мл, а не се водело евиденција за периодот 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 што биле дел од истражувањето биле сместени во пуштен систем и молзени во молзилиште, додека останатите 17% имале роботско или комбинација со роботско молзење [21].

Во нашата студија сите фарми беа со врзан систем и најчесто се употребува слама или пилевина за простирка, а хигиената на фармата пред сè зависи од самиот одгледувач, додека во Шведска движењето низ коридорот до самото молзилиште не може лесно да се одржува и голем број крави, особено со ниска МЖ, лесно се валкаат. Со ова се согласни и Taponen S. et al. [135] кои констатираат поврзаност меѓу слободниот систем на држење на кравите и застапеноста од *Streptococcus dysgalactiae* и *Strep. uberis*. Во Финска истражувањето е обемно и добиениот процент е само од крави

коишто 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 и заедно со *Strept. uberis* претставуваат сериозна закана за млечната индустрија [142]. Негови резервоари се инфицираните МЖ, ѓубривото и други органски материји, 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 dysgalactie* 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 која било 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 можност 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 во 10 исти фарми, (42%), а само една крава беше со две инфицирани четвртини со *Lactococcus lactis*. Споредено со другите истражувања во однос на застапеноста на СМ предизвикан од лактококите, тие воопшто не се прикажани како посебна група на причинители, освен ако истражувањето не е насочено кон целно утврдување на овие причинители. За ваквиот занемарлив однос кон нив постојат две причини. Примарно, лактококите пред сè се широко користени како мезофилни стартер-култури во млечната индустрија. Многу малку се проучувани и истражувани како причинители на болести, иако последните години се сè поприсутни како причинители на маститис кај говедата, клинички случаи кај луѓето и болести кај рибите [145]. Plumed-Ferrer C. et al. [145] утврдиле дека лактококите што потекнуваат од крави со маститис, иако се генотипски слични со стартер-културите, сепак имаат фенотипска разлика и тоа: поголема толеранција на 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 стартер-културите и тие карактеристики биле вкупно

прифатени за сите лактококи како група. [145]. Во нашето истражување ја потврдиме нивната присутност во млечните четвртини при трикратното земање млеко, како и силниот имунолошкиот одговор претставен 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. [146] и Plumed-Ferrer C. et al. [145] кои констатираат дека *Lactococcus lactis* е тесно поврзан 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 нивата процентуална застапеност како причинители на СМ да е превидна. Fortin M. et al. [147] констатирале дека 11% од *Enterococcus spp.*, 24% од *Streptococcus uberis*, 3% од *Streptococcus bovis* и 1% од *Streptococcus dysgalactiae* биле всушност *Lactococcus spp.*

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 што 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 спрема неповолните услови во надворешната средина која 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 последица на примената на протоколи што се применуваат при актот на молзење или ентерококите воопшто не се истражувани. 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 претставени само како група и не биле прикажани детално по видови [30, 129]. Во истражувањето на Cervinkova D. et al. [136] во Република Чешка пријавиле застапеност на ентерококите од 12%, каде

Enterococcus faecalis бил доминантен со 6.6%, *Enterococcus caecorum* со 3.9% и *Enterococcus solitarius* со 1.5%. Во Кина тој процент бил 4.5%, каде што се барал само *Enterococcus faecalis*, во Германија 0.2% за *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium* [151, 114]. Во Кореја застапеноста на ентерококите била 4.8%, со *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 потврдуваат и Cariolato D. et al. [150] кои утврдиле значително повеќе детерминанти на вирулентност во *Enterococcus faecalis* во однос на *Enterococcus faecium*. Иако процентот на застапеност на ентерококите е различен, Nam H. M. et al. [152] наведуваат дека тој може да варира 0-21.2%. Овој процент е повисок во истражувањата каде мострите 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 бактерии. Иако ентерококите не се изразито патогени за молзните крави, сепак постои загриженост за јавното здравје, пред сè поради можноста за пренесување од МЖ на луѓе тои тоа преку консумирање сирово непастеризирано млеко и млечни производи [148]. Кај луѓето предизвикуваат 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 млеко од сите испитани фарми беше 603.000 кл./мл. Chassagne M. et al. [153] во Франција пријавиле просек на БСК по стадо 135.000 и 265.000 кл./мл следствено на стада со низок и среден БСК додека Pamela L. Ruegg [179] во САД пријавила просек на БСК во стадо 194.000 кл./мл (179). За разлика од нив, на ниво на крава Guarin J. F. et al. [154] пријавил БСК 37.500 кл./мл, во Висконсин, САД, додека на ниво на првотелка и крава во Шведска, Hagnestam-Nielsen. C. et al. [155] пријавил 95.000 и 55.000 кл./мл.

Различни автори прикажале различен процент на загуба во производството на млеко поврзано со БСК. Според Garcia R. R. et al. [86] загубата била 2.5% во производството на млеко на секои 100.000 кл./мл, зголемување над основното ниво од

200.000 кл./мл. Ако овој податок го споредиме со нашите резултати, загубите на нашите фармери би биле пад на млекопродукцијата за 10% дневно. Dohoo I. R. et al. [18] таа загуба ја претставиле во литри и би била 280 литри по крава за време на една лактација. Додека Hagnesten-Nielsen. C. et al. [155] 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 кои се породувале повеќепати. Покрај намалената продукција, потврдено е и влијание на високиот БСК врз составот на млекото што го потврдуваат повеќе автори [85, 87, 88, 89].

Дополнително, неопходно е да се укаже на влијанието на БСК врз јавното здравје. Европските регулативи, како и Правилникот издаден од Агенцијата за храна и ветеринарство во РСМ (Службен весник на РМ, бр. 26 од 21.2.2012 год) укажуваат дека за исправно млеко се смета млекото што го исполнува критериумот, т.е. БСК <400.000 кл./мл по фарма. Млекото што 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 фарми, сепак тие се избрани по случаен избор и се еден вид репрезент, па укажуваат дека во иднина е потребна обемна студија и конкретни пресеци за застапеноста на СМ на ниво на држава.

Долго време се испитувало дали млекото со висок БСК, т.е. ингестијата на говедските 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 што укажуваат дека консумацијата на млеко со висок БСК директно влијае врз здравјето на конзументот, ниту, пак, производите направени од млеко со висок БСК;
- најголем ризик од млекото со висок БСК за здравјето на луѓето е конзумирање на непастеризирано и неправилно пастеризирано млеко;
- пастеризацијата го намалува бројот на различни микроорганизми, но често не го поништува ефектот на токсините произведени од маститис патогените М/И. Преносот на термостабилни токсини произведени од маститис патогени М/И во млекото се потенцијална опасност. Ентеротоксинот произведен од *S. aureus* во млекото од инфицираните крави е вклучен во случаи на труење со 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 патогени или нормална флора на кравите, се јавуваат за време на молзењето или по него и не мора да потекнуваат од ИМИ.
- Евидентирани се прикази дека *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*, предизвикувачот на паратуберкулозата (Џонова болест) кај преживарите, е изолиран од хуманите пациенти со Кронова болест и може да преживее во некои од применуваните процедури за пастеризација на млекото. Иако можната поврзаност меѓу прелевањето на *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* во млекото и последователното 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 затоа што поради зголемување на ензимската активност во млекото се добива финален производ со пократок рок на траење, промени во осетливоста на содржината или непосакувани органолептички карактеристики [6, 23]. Повисокото ниво слободни масни киселини со краток синцир во млекото даваат солен и горчлив вкус [5, 23], а индиректно може да ги инхибираат starter-културите во производството на сирење и јогурт, а може и да го пренесат горчливиот вкус на овие производи [5, 18]. Fernandez. A. M. [84] го истражувал влијанието на БСК во млекото врз квалитетот и трајноста на јогуртот што 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-тиот 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. Sharma N. et al. [23] 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%. Исто така, 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 Y. et al. [158] ја дефинирале поврзаноста меѓу

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 по пастеризацијата. Затоа предложиле преработувачите на сирово млеко да користат млеко со низок БСК кога се бара подолг рок и квалитет на млекото со над 14 дена складирање. Дополнително, високиот БСК во лактофризерот е врзан со резидуи на антибиотици во млекото [83].

Ваквата состојба укажува на што побрз и посериозен пристап. Од една страна ќе треба да се едуцираат и самите фармери на нови навики и протоколи со цел добивање 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 на крај потребно е вклучување на релевантните институции на државно ниво со тековни истражувања и стратегии, како и формирање бази за состојбата на БСК по крава и класификации на фармите спрема квалитетот на самото млеко. На тој начин многу полесно би имале можност за следење и контрола над самите крави, а тоа индиректно би влијаело и 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 меѓу 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 што дале БСК <200.000 кл./мл, додека 19% од бактериолошки позитивните четвртини потекнуваат од четвртини чиј БСК бил од 200.000-400.000 кл./мл. Во слично истражување како нашето, Souza N. F. et al. [159] утврдиле 13% бактериолошки позитивен наод во четвртини што имале БСК <100.000 кл./мл, додека 17% биле бактериолошки негативни од четвртините што имале БСК >200.000 кл./мл. 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*, *S. 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 дијагностичка алатка која со сигурност може да ги разликува инфицираните од неинфицираните четвртини. Pyörälä S. [160] наведува дека со примена на индиректните

тестови може да се дојде до погрешна класификација која се движи 25-50%. Ваквите резултати укажуваат дека можеби доколку се користи само БСК како индикатор за СМ, тој лимит би требало да се намали, со што би се намалил и бројот на лажно негативни четвртини. Секако, ова важи за мострирање на ниво на четвртина, а не на цела МЖ. Forsback L. et al. [87] наведуваат дека поради разредувањето и кога БСК бил <100.000 кл./мл на ниво на МЖ, 10% од четвртините од овие крави имале по една инфицирана четвртина. Со ова се согласни и други автори, Kovachevich S. V. et al. кои предлагаат дека БСК <50.000 кл./мл е здрава четвртина, додека Sharma N. et al. [23] и Pyörälä S. [160] за лимит го предлагаат БСК <100.000 кл./мл..

Просечниот БСК за најчестите причинители во нашето истражување беше највисок за *Strep. agalactiae* (2.065.452 кл./мл), *S. aureus* (1.577.202 кл./мл), *Strep. uberis* (1.406.091 кл./мл) и *CoNS* (735.241 кл./мл). Овие наоди се во согласност со изведената анализа на Djabri V. et al. [80] во која, користејќи 21 различно истражување, утврдил просечни вредности на БСК за *Strep. agalactiae* (3.792.000 кл./мл), *Staph. aureus* (1.426.000 кл./мл), *Strept. uberis* (2.065.000 кл./мл) и *CoNS* (475.000 кл./мл), додека Tomazi T. et al. [58] пријавиле 315.300 кл./мл, но само за *Staph. chromogenes* како претставник од групата *CoNS*. 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 што при првото земање на млекото дале микробиолошки наод $\text{cfu} > 50/0.01\text{ml}$ (С), 74% од нив и финално биле класифицирани како позитивни. При споредба меѓу двете последователни тестирања и финалната класификација на четвртината, 89% од четвртините завршиле како позитивни кога на двете тестирања имале $>50 \text{ cfu}/0.01\text{ml}$ (СС). Седумдесет и пет проценти од четвртините прогласени се како позитивни кога на последователните две тестирања дале $>50 \text{ cfu}/0.01\text{ml}$ и $10-50 \text{ cfu}/0.01\text{ml}$. (СВ), а со 72% со позитивен наод како финален резултат завршиле четвртините кои на двата последователни микробиолошки теста дале $\text{cfu} 10-50/0.01\text{ml}$. 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 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 се согласни и DoHoо I. et al. [161] кои укажуваат дека трикратното земање примерок ја дава најдобрата комбинација на сензитивност и специфичност, но во споредба со единечното мострирање се обезбедува минимално скромна добивка. Сепак, сè уште како златен стандард се смета трикратното земање примерок млеко.

Изолирањето на причинителот и БСК можат да се гледаат како два одвоени фрагменти. Andersen S. et al. [162] наведуваат дека БСК е одговор на воспалението на инфизираните четвртини, но не и нужна инфекција на МЖ, и обратно, изолирањето на причинител не значи по секоја цена и воспаление на четвртина. Висината на БСК пред сè зависи од типот на причинителот, имунолошкиот статус на кравата и степенот на оштетување на жлезденото ткиво. Од друга страна високиот БСК може да доведе до самоизлекување на четвртината и треба да помине подолг период за да се нормализира актот на воспаление Souza N. F. et al. [159].

Неминовна е интегрираност на микробиолошкиот преглед и БСК во програмите за контрола на СМ. Спрема цитираната литература и нашите добиени резултати во ерадикацијата на СМ на нашите фарми првично 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 што 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.

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 одредени 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. [163] утврдиле изразено повисока средна вредност на хигиенската проценка на нозете (проценка од 3.2), додека останатите средни оценки од телото се движеле од 2.3 до 2.6. 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, како и употребиле една вкупна проценка за целата МЖ. Слично и Tongel P. et al. [20] користеле петостепен систем на бодување, но во овој случај ги оценувале само нозете и МЖ и добиле средна вредност 2 и 1,9. Со ист систем на бодување како нашиот работеле Schreiner D. A. et al. [96], но ја оценувале само хигиенската проценка на МЖ и нозете и добиле средни вредности, и тоа 2.09 и 2.33. Споредувајќи ги резултатите меѓу различните студии, вклучително и нашата, за хигиенската проценка на нозете и МЖ се утврдуваат прилично слични податоци. Исклучок е истражувањето на Jeffrey K. R. et al. [163] во кое хигиенската проценка за нозете е далеку повисока и од нашата проценка (3.2) – која, пак, е многу повисока од истражувањата на Tongel P. et al. [20] и Schreiner D. A. et al. [96]. Сепак, треба да се има предвид дека нашето истражување е изведено на фарми со врзан систем на одгледување, а исто така ние работевме на поголем број фарми со помал број крави, спротивно на фармите во другите истражувања. Одовде може да се извлече заклучок дека хигиенската проценка 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 проценка на бутот во нашата студија е повисока (3.1) во однос на истражувањето на Jeffrey K. R. et al. [163], каде таа проценка беше 2.3. Висината на хигиенските оценки на останатите делови од телото, вклучително и бутот, е под влијание на менаџментот на фармата, конзистенцијата на изметот и зачестеноста на чистење на фармите, што го потврдуваат и Schreiner D. A. et al. [96]. За врзаниот систем на одгледување според нашите добиени резултати најзасегнат, со највисока проценка, 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 проценка за нозете [96]. И SantAnna A. C. et al. [95] 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. Особено за врзаниот систем најголемо значење ќе има зачестеноста на чистењето на лежиштето и користењето простирка, бидејќи со ваквиот систем на одгледување кравата во истото место дефецира, лежи и се молзе, немајќи друг избор. SantAnna A. C. et al. [95] во своето едногодишно истражување на хигиенската оценка 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. Иако ние не ги истражувавме карактеристиките на индивидуалните боксови на сместување во врзаните системи, сепак Zurbringg K. et al. [164] констатирале дека со подигање на попречната вратна греда за 2.5 цм се зголемува оценката за чистота на МЖ за 0.2%, додека со зголемување на должината на ланецот за врзување за 2.5 цм се намалува процентот на валкани нозе за 1.4%. Дополнително, истите автори наведуваат дека пократките лежишта доведуваат до поголем број 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 ќе се во контакт со самото губре [164]. Исто така Jeffrey K. R. et al. [163] наведуваат дека постарите и пресно отелените крави се повеќе склонени кон валкани МЖ и тоа кај првите поради пониско спуштената МЖ, додека кај вторите поради поголемиот внес сува материја и производство на губриво со послаба конзистенција.

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 слободен систем, со цел максимално искористување на придобивките од слободниот систем на одгледување, како и потенцијалот што 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 можат да бидат поврзани со зголемена појава на болести, пред сè маститис, предизвикан од околинските патогени М/И [95]. Од нашите добиени резултати, при споредба на хигиенските оценки од испитуваните области од телото со БСК на ниво на

крава, не утврдивме значајност во нивното поврзување, освен што 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. [163] 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. Исто така и во истражувањето на Schreiner D. A. et al. [96] утврдено е линеарно зголемување на БСК со зголемувањето на хигиенската оценка и на нозете и на МЖ. Тие добиле поврзаност меѓу хигиенската оценка на МЖ и СМ предизвикан од контагиозен причинител и тоа за секоја хигиенска оценка (1-4), застапеноста значително се зголемувала: 2.8, 4.7, 5.1 и 7.4%. Исто така, значително 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, која иако се зголемува со зголемување на хигиенската оценка, сепак овие автори не утврдиле статистичка значајност (96). Исто така, Marcela de Pinho M. et al. [119] утврдиле поврзаност помеѓу хигиенската оценка на МЖ и застапеноста на СМ, но без значајност помеѓу контагиозните и околинските причинители. Тие констатирале и специфично намалување на БСК со зголемување на хигиенската оценка, што е спротивно бидејќи БСК го следи 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 што се постојано изложени на нечистотија. Сепак, нашето истражување не ја утврди таа поврзаност, спротивно, се констатира позитивна статистичка значајност помеѓу чистотата 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, и непознат здравствен статус на МЖ, за разлика од Jeffrey K. R. et al. [163] кои истражувањето го направиле на фарми каде што немало присуство на контагиозни причинители на СМ, а кравите кои на двата последователни месечни извештаи за БСК имале >200.000 кл./мл биле изземени од истражувањето, и при ваква

состојба можат многу полесно да ја најдат поврзаноста меѓу хигиенската оценка, БСК и околинските маститис патогени.

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

- **Примена на различни хигиенски практики во подготовката на МЖ за молзење.** Marcela de Pinho M. et al. [119] наведуваат дека применувањето соодветна рутина пред молзењето е превентивна мерка против појавата на ИМИ . Schreiner D. A. et al. [96] наведуваат дека фармите со посилна санитација и хигиенска практика имале помала инциденца на КМ во однос на фармите со помалку применети практики, како и дека примената на дезинфекција на боските пред молзење е значително поврзана со БСК во лактофризерот. И покрај сите применети мерки, Chassagne M. et al. [153] укажуваат на можен пропуст ако редовно не се заменуваат растворите за потопување во чашките и ако самите чашки не се чистат со силни дезинфекциони средства за да се спречи трансферот на инфекции од крава на крава. 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 нуспроизводи што овозможуваат размножување на бактериите (153). Во нашето истражување само на две фарми се користеше потопување на боските по молзење, но на ниту една не се применуваше дезинфекција пред молзење. Можеби причината за позитивна корелација меѓу чистото млечно огледало и застапеноста на СМ е токму во овој процес. Млечното огледало во нашето истражување, по 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, при што дел од изметот се слева кон 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 добро

управување и хигиенски мерки, но сепак и изборот на млечни крави кои се помалку подложни на маститис е важна мерка за разгледување [165]. Хиперкератозата е израз што 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. [168] навеле дека застапеноста на хиперкератозата на боските кај кравите што се молзат машински варира 22-54%. Сепак од Teat Club International, Mein. G. A et al. [169] за постигнување задоволително ниво на оштетување на крајот од боските по стадо не треба да премине за $R(3) + VR(4) > 20\%$ или само за $VR(4) > 10\%$ [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 заемен 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 30-70%, за S (2) опсегот се движел 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. [97], каде што тој процент е далеку повисок од сите. За вториот и третиот степен на оштетување на боските (S и R) процентите се со изразено големи варијации меѓу сите студии. Причината за хиперкератозата е сèуште недообјаснета. Наведени се голем број фактори што 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 меѓу 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 со тоа дека хиперкератозата е констатирана и при рачно молзење [171, 172]. Спротивно од нашата, другите студии имале слободен систем на одгледување, при што и промената на времето и ветерот може да влијаат врз кожата на боските. Со ова се согласни Sandrussi A. et al. [120] кои 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 . Временските услови и климата како причина за хиперкератоза ги наведуваат и Emre B. et al. [168], Asadpour R. Et al. [166], Guarin J. F. et al. [170].

Во нашето истражување само на две фарми се применуваше потопување на боските по молзењето и тоа неконтинуирано, што е различно од наведените истражувања каде потопувањето на боските е задолжителна хигиенска практика по молзењето. Иако примената на дезинфекционите средства е задолжителна практика во превентивата на маститисот, сепак тие предизвикуваат хемиско иритантно дејство [120] што може да е дополнителна причина за ниската хиперкератоза во нашето истражување [169]. David E. G. Et al. [172] во компарација на примена на средства за дезинфекција само на левите четвртини од 56 крави кои биле предмет на испитување, констатирале дека третираните четвртини имале понизок БСК, но повисока средна оценка за хиперкератоза, додека добиле спротивен резултат за нетретираните четвртини, т.е пониска средна оценка за хиперкератозата, а повисок БСК.

Со споредените истражувања најблиски резултати во однос на боските оценети како негативни (N) имаме со истражувањето на Guarin J. F. et al. [170]. Но, потребно е да се напомене дека нивното истражување е спроведено само на крави што се отелени само еднаш, а староста на кравите е веќе востановен фактор за хиперкератоза, така што Juozaitiene V. et al. [167] наведуваат дека таа е поизразена кај кравите кои се породувале повеќе од 5 пати. Покрај староста, и фазата во тековната лактација се истакнува како фактор, односно хиперкератозата постојано се зголемува до 4-5 месец по отелувањето, а потоа постепено се намалува [171]. Исто така, како дополнителна причина за хиперкератозата се истакнуваат и анатомската предиспозиција, т.е. острите врвови се повеќе склони кон хиперкератоза [173], како 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].

Neijenhuis F. et al. [173] и Juozaitiene V. et al. [167] укажуваат дека боските со повисок степен на хиперкератоза се во значителна корелација со појавата на КМ, додека во однос на поврзаноста 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 CM, 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 заемна последователност на ИМИ и БСК е очекувана, бидејќи пред сè 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 по молзењето [119]. David E. G. et al. [172] наведуваат дека боските со оштетен крај, каде што се задржуваат капки млеко, им овозможуваат соодветна средина за колонизација на маститис патогените бактерии, и 50% од биопсиите на хиперкератинските боски биле колонизирани од грам-позитивни бактерии во *stratum corneum*. Guarin J. F. et al. [154] утврдиле поврзаност само помеѓу највисокиот степен на хиперкератоза (VR) и БСК. За разлика од нас, тие за прогласување на четвртината за позитивна на CM 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, којшто е многу низок во споредба со нашиот. Со сличен наод се и Emre B. et al. [168] кои утврдиле значителен пораст на БСК паралелно со зголемување на степенот на хиперкератозата, додавајќи дека зашилените боски имаат поголема склоност кон хиперкератоза.

Во истражувањето на Bhutto L. A. et al. [165] и Manzi M de P. et al. [119] констатирано е зголемување на застапеноста на ИМИ во четвртините, соодветно на зголемување на степенот на хиперкератозата. Ваквиот податок е во согласност со нашите добиени резултати во однос на ИМИ. Manzi M de P. et al. [119] наведуваат дека со секој зголемен степен на хиперкератозата се зголемува шансата за ИМИ за 30%. Bhutto L. A. et al. [165] забележале и нестатистички значајна поврзаност меѓу (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*, спротивно од нас што не утврдивме поврзаност меѓу одреден маститис патоген причинител и степенот на хиперкератоза. Asadpour R. et al. [166] и Manzi M de P. et al. [119] не констатирале никаква поврзаност и меѓу контагиозните и околинските патогени М/И и степенот на хиперкератоза. 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 не само што не добиле статистичко

зголемување на БСК, туку Manzi M de P. et al. [119] констатирале и намалување на БСК за вториот степен на хиперкератоза во однос на БСК за првиот степен, а Vhutto L. A. et al. [165] добиле и понизок БСК за вториот и третиот степен на хиперкератозата во однос на првиот степен на хиперкератоза.

Прикажаните резултатите добиени од истражувањата од веќе цитираните автори укажуваат на несвојствена корелација помеѓу БСК и ИМИ од една страна со степенот на хиперкератоза од друга страна. Ваквата состојба во иднина бара дополнителни истражувања што ќе бидат прецизни и унифицирани во сите постапки, т.е. при прегледот на самите боски, начинот на собирање на мострите, како и нивното толкување. 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 што можат да влијаат врз појавата на СМ (*како 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 [172] и Sandrucci A. et al. [96] не констатирале никаква поврзаност меѓу степенот на хиперкератоза и БСК, односно хиперкератозата не ја гледаат како фактор за појава на СМ (172, 96). David E. G. et al. [172] во својата студија од два експеримента, во првиот експеримент не утврдиле поврзаност помеѓу БСК и степенот на хиперкератоза. Најверојатно ваквиот исход е поради премногу нискиот процент на хиперкератоза со оценка VR (4) (0.5%) и високиот стандард што се применувал при молзењето, додека во вториот експеримент на компарација на хиперкератозата и БСК, каде на боските од десната страна се применувала дезинфекција по молзењето, додека од левата страна не се применувала дезинфекција, утврдиле очигледна корелација меѓу хиперкератозата и БСК во отсуство на дезинфекција на боските. Од друга страна Sandrucci A. et al. [120] во својата студија на 15 различни фарми во Италија со низок БСК во лактофризерот, ја занемаруваат хиперкератозата како фактор за СМ, но сепак констатираат дека колку поголем број на превентивни хигиенски практики се применуваат на фармата толку е понизок БСК во истата. Поточно, применетите практики, како: исфрлање на првите млазови, потопување на боските пред молзење и потопувањето на боските по 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 која било четвртина [174, 175]. Со ова се согласни и нашите резултати, каде констатираме дека сите четвртини подеднакво се склони кон инфекција и 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 наспроти задни четвртини. Но, сепак, застапеноста на СМ (М, V и N) во однос на задните наспроти предните четвртини во процентуалната застапеност беше 52% наспроти 48%, додека на ниво на четвртина највисоката застапеност на СМ е идентификувана во ЗЛ 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 ЗЛ четвртина. Спротивно од нас, Ndahetuye J. B. et al. [137] констатирале поголема застапеност на СМ на задните (46%) во однос на предните четвртини (44%). Слични резултати добиле и Metodija T. et al. [176] каде добиле застапеност на СМ со однос на задните и предните четвртини 61% наспроти 39%, како и разлика на ниво на четвртина, при што тој сооднос бил ПЛ, ПД, ЗЛ и ЗД 18%, 21%, 23% и 37%. 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. [8] констатирале статистички значајни промени како за БСК така и за ИМИ, т.е. 73.000 кл./мл имало повеќе во задните отколку во предните четвртини, додека бактериолошка изолација на причинителот била 36% во предните, а 51% во задните четвртини. Овој податок статистички го потврдува и Berkema H. W. Et al. [177], додека Donagh P. V. et al. [175] констатираат дека ПЛ четвртина е најмалку склона кон ИМИ во однос на останатите четвртини.

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 [174, 175]. Додека, од друга страна, и повеќето автори: Slyzius E. et al. [8], Guarin J. F. et al. [154], Slyzius E. et al [178] констатирале дека предните боски се подолги од задните и можеби на тој начин е поотезнат, т.е. подолг и самиот пат на бактериите до жлездениот паренхим за да предизвикаат инфламација. И нашите резултати укажуваат на зависност меѓу висината на МЖ во однос на застапеноста на СМ. Кравите со МЖ под самиот скочен зглоб имаат значително повисок БСК, но не се утврди статистичка значајност меѓу 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 меѓу 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 од (*S. aureus*, *Strep.uberis* и *Strep.agalactiae*) не се случува само од крава на крава, туку постои и меѓусебна зависност меѓу четвртините во рамките на кравата, па во стадото каде што има поголем процент на инфицирани четвртини, ризикот неинфицираните четвртини да заболат е голем [176, 177].

Дополнително склоноста кон СМ на задните четвртини во однос на предните е и во разликата во количеството на продукција на млекото, при што застапеноста на СМ се зголемува со зголемување на производството на млеко [175, 176]. Slyzius E. et al. [178] утврдиле дека задните четвртини создаваат за 16.4% повеќе млеко од предните четвртини, додека продукцијата меѓу левите и десните четвртини не се разликувала (178). Slyzius E. et al. [8] утврдиле 12% повеќе бактериолошки позитивни примероци по четврт кога производството на млеко во предните четвртини беше <45%, отколку 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 меѓу четвртините е до 11%.

Иако Guarin J. F. et al. [170] утврдиле поголем број бактерии на кожата од задните боски, сепак застапеноста на КМ била статистички поголема кај предните четвртини и најголем број од предизвикувачките М/И биле околинските маститис патогени. Ваквата состојба може да е и последица на тоа што задните четвртини имаат повисок БСК штоги прави поотпорни кон развивање на КМ. Исто така, истите автори

како причини наведуваат и други ризик-фактори што се базираат во разликата на подготовката за молзење меѓу предните и задните боски.

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 на MALDI-TOF MS вкупно се процесуирани 529 изолати, од кои успешно се идентификувани до вид 86.58% (n=458), со детерминација на 65 различни бактериски видови. До ниво на род се идентификувани 1.13% (n=6) и тоа *Streptococcus spp.* и *Corynebacterium spp.*, додека 12.29% (n=65) не беа идентификувани. Секој изолат беше идентификуван двапати, а за прифатлив резултат го земавме само доколку процентот на споредливост со протеинскиот профил од базата беше >85%. Речиси во сите фарми што беа дел од истражувањето имаше по некој не идентификуван причинител. Сите изолати што се специфични како причинители на СМ беа идентификувани лесно и брзо до ниво на вид. Слични резултати на нашето истражување во однос на успехот на идентификација со MALDI TOF MS 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 што не се чести во клиничката пракса, а како причина се наведува дека станува збор за отсуство на пикови што се потребни за успешна идентификација. Тие исто така укажуваат дека нема статистичка значајност во идентификувањето меѓу грам-позитивните и негативните бактерии [123]. Bettina N. et al. [124] 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, при што се детектирани 24 родови и 61 вид.

Последните години *CoNS* стануваат најчестите патогени причинители на СМ кај кравите и претставуваат хомогена група за која со конвенционалните тестови е отежнато да се направи прецизна дијагноза на видовите [180]. Поради тоа сè повеќе се испитува примената на MALDI-TOF MS како алатка во идентификувањето на *CoNS*. Во истражувањето на Tiago T. et al. [180], каде се изолирани само *CoNS* од СМ со MALDI-TOF MS прецизно биле идентификувани 95.37% (103/108) изолати, при што потврдата на изолатите е направена со PCR-RFLP. Дополнително во истражувањето на

Banach T. et al. [181] успешноста на идентификацијата на *CoNS* била 81.8%. Слично истражување е направено и од Yasser S. M. et al. [182] каде 511 изолати биле испитувани на MALDI-TOF MS, при што успешно до вид биле идентификувани 78% (n=399). Од 399 идентификувани изолати, 373 припаѓале на *CoNS* и притоа 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), што укажува дека MALDI-TOF MS има висока осетливост во идентификувањето на бактериите што потекнуваат од млекото, додека бактериите што се од околината (зафатени на самите боски) претставуваат и дел од нормалната микрофлора на кожата и 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 и како средство за заштита од неповолните околински услови. Во истражувањето од хуманата медицина од Abdessalam Ch. et al. [122], со 720 изолати од различни извори (урина, измет, респираторен тракт, репродуктивен тракт, крв и др) правена е компарација меѓу двата главни произведувачи на MALDI-TOF MS Bruker и Shimadzu, каде процентот на идентификација бил 94.4% (680) и 88.8% (639), а како точни вредности се земале само доколку процентот на споредливост на протеинскиот профил бил >70%. Дополнително, Bettina N. et al. [124] 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* при што изразуваат помала хемолиза и задоцнета реакција на коагулаза тестот. Во вакви случаи MALDI-TOF MS може успешно да го идентификува овој патоген, што е од големо значење знаејќи дека ваквиот облик на *Staphylococcus aureus* предизвикува хронични и рекурентни инфекции токму поради состојбата на SCV која му овозможува интрацелуларен опстанок.

Во вкупните податоци се забележува дека процентот на неидентификувани бактерии не поминува >22% како во хуманата така и во ветеринарната медицина [182]. Во нашето истражување добиениот процент на неидентификувани изолати беше 12%, и е речиси во согласност со другите истражувања што ја користеле оваа дијагностичка алатка и притоа некаде тој процент бил поголем или помал. Една од причина може да е тоа што SARAMIS базата на податоци која ја користевме ние беше пред сè наменета за

хумани изолати и не беше надополнета со нови бактериски профили од причинителите кај животните или округот на нивната локална микрофлора, карактеристична за тукашните причинители. Дополнително и други автори наведуваат и други фактори што можат да влијаат неповолно 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, а мешаната култура MALDI-TOF MS не може да ја идентификува со оглед на добивањето различни спектри [124, 180]. Оваа постапка прелиминарно зависи од квалификуван персонал, а сепак се одразува како негативност на самиот апарат. Понатаму, нанесување на премногу голем инокулум на самата плоча може истотака да влијае на идентификацијата, т.е. матриксот нема соодветно и во доволна мера да го кристализира/дехидрира примерокот, па ќе се создадат специфични спектри што не можат да бидат соодветно толкувани [181]. Исто така, фазата на раст, условите на културата, како и селективните медиуми се наведени како причини што можат да влијаат врз постапката на диференцирање [181]. И покрај тоа што иницијално претставува скап апарат [180], трошокот на самите анализи е со оној добиен со примена на вообичаена лабораториска опрема за бактериологија [122].

Нашите добиени резултати, како и споредбата со податоците од литературата за примената на MALDI-TOF MS во дијагностицирањето на причинителите на СМ, укажуваат дека тој претставува соодветна алатка за прелиминарна идентификација, особено во тријажните истражувања на фармите, каде би се собрале голем број причинители и потребна е нивна брза, соодветна и евтина идентификација. Останатиот мал процент што не е идентификуван, ако е статистички значаен, би се идентификувал со посовремените дијагностички алатки, пред сè молекуларните алатки кои се неминовен златен стандард во дијагностицирањето. Од добиените причинители нивните профили можат да се вметнат во базата на MALDI-TOF MS која може постојано да се проширува и дополнува со нови бактерики видови што претставува и голема предност.

Познавањето на АМО на причинителите на СМ е значајна пред се за јавното здравје со цел намалување на трансферот на отпорни бактерии врз хуманата популација преку млекото и млечните производи. Исто така, АМО е од големо значење за докторите по ветеринарна медицина при избор на соодветен антиминобен лек во терапија на маститис.

Според истражувањето на Н. Mekonnen et al. [183] во случаи кога утврдената отпорност на причинителот кон одреден антимикробен лек е до 25%, истиот, се класифицира како причинител со низок степен на АМО. Во спротивно, доколку утврдената АМО изнесува над 75%, причинителот се класифицира како причинител со висок степен на АМО. Во ова истражување АМО над 25% беше утврдена кај: *S. agalactiae* на tetracycline, *E. coli* на tetracycline и cephalothin, *S. aureus* на ampicillin и penicillin и *S. uberis* на pirlmycin и tetracycline.

Од изолатите на *S. uberis*, АМО беше утврдена на ampicillin (3.5%), erythromycin (7%), pirlmycin (29%) и tetracycline (46%). Кај два изолати од овој причинител беше утврдена мултирезистентност (резистентност на најмалку еден антибиотик од три класи на антибиотици) на erythromycin (макролиди), pirlmycin (линкозамиди) и tetracycline (тетрациклини). Кај 6 изолати од овој причинител беше утврдена резистентност на два антимикробни лекови одн. pirlmycin и tetracycline. Овие резултати за АМО соодветствуваат со истражувањето на Tomazi et al. [184] каде со примена на идентичен тест и референтни вредности, била утврдена отпорност на tetracycline (55%), pirlmycin (39%), erythromycin (28%) и ceftiofur (36%). Во истражувањето на Chehabi C. N. et al. [185] каде била користена идентична метода за утврдување на АМО, но со други референтни вредности била утврдена отпорност на tetracycline (21%) и erythromycin (6,6%), додека во истражувањето на Pitkälä. A. et al. [129] била утврдена отпорност единствено на tetracycline (2.2%). За разлика од користената методологија во ова истражување како и во веќе споменатите [129, 184, 185], во истражувањето на Leskoves P. et al. [186] со примена на Диск дифузишки тест била утврдена отпорност над 80% на tetracycline, kanamycin, streptomycin и neomycin.

Антимикробната отпорност кај *S. aureus* беше утврдена на два антимикробни лекови одн. на ampicillin (25%) и penicillin (29%), каде само еден изолат беше отпорен на еден антибиотик додека останатите 6 беа отпорни и на двата антимикробни лекови. Споредно со истражувањето во Данска [185], каде биле користени идентични референтни вредности била утврдена отпорност на penicillin (16%), sulphadimethoxine (29%) и erythromycin (4.8%). Понизок степен на АМО бил утврден во истражувањето на Saini V. et al. [187] во Канада одн. 8.8% и 7% за penicillin и sulphadimethoxine соодветно, додека отпорноста за ampicillin, erythromycin, oxacillin, pirlmycin, penicillin/novobiocin, ceftiofur, cephalothin и tetracycline беше пониска од 3%. Со примена на диск дифузишки тест била утврдена отпорност на penicillin (81%), ampicillin

(83%) и amoxicillin (82%) [188] одн. 99,6% и 99,8% за ampicillin и penicillin соодветно [186].

Во ова истражување кај *S. agalactiae* беше утврдена отпорност на tetracycline (75%), oxacilline (17%), и два изолата покажаа мултрезистентност, едниот изолат на два, додека другиот на пет антимикробни лекови, кои припаѓаат на две класа на антимикробни лекови. Во истражувањето на Tomazi T. et al. [189] со користење на идентичен тест и идентични референтни вредности исто така бил утврден висок процент на отпорност на tetracycline (69%), erythromycin (25%) и pyrilimicin (16,5%). Според ова истражување високата отпорност на tetracycline се должи на долготрајното користење на овој антибиотик во терапија на КЈ и СМ. Во истражувањето на Chehab Sh. N. et al. [185], исто така бил утврден висок степен на отпорност на tetracycline (77%) и на streptomycine (100%). Со примена на диск дифузишки тест во истражувањето на Klimiene I. et al. [188] била утврдена отпорност на penicillin (34%), ampicillin (46%) и amoxicilin (25%).

Од 6 испитани изолати на *E.coli* 3 изолати беа отпорни на tetracycline додека 2 беа отпорни cephalothin, каде еден изолат беше отпорен и на двата антимикробни лека. Во истражувањето на T. Tomazi et al. [190] била утврдена АМО на ampicillin (96%), и >23% отпорност према tetracycline, cephalothin и sulfadimethoxine Со идентична метода за утврдување на АМО, а со примена на различни референтни вредности од нас Chehab Ch. N et al. [185] утврдиле отпорност на ampicilin (11%), tetracycline (11%), sulphometoxazole (18%) и trimetoprim (16%), додека Saini V. et al. [187] утврдиле отпорност на *E. coli* од 15% само на tetracycline, а од 13 антимикробни лекови, *e.coli* не дала отпорност само према два антимикробни лека, а на останатите процент бил во обсег од 0.3 до 9.2%. Спротивно од веќе споредените студии, со примена на диск дифузишки тест Alekish M. O. et al. [191] констатирале висок степен на отпорност према tetracycline (96%), penicillin (94%), ampicillin (84%), erythromycin (93%). Sulphametoxazol/trimetoprim (100%), исто така и Marie-Anne Botrel et al. [30] во Франција утврдиле отпорност према streptomycin (13%), tetracycline (10%), amoxicillin (9.7%), додека за останатите антимикробни лекови тој процент беше < 80%.

Користењето на различни методи и референтни вредности за утврдување на АМО претставува голем недостаток кој оневозможува адекватна споредба на

добиените резултати за отпорноста на причинителите на маститис и унифицирана категоризација на истите како осетливи или отпорни [129, 184, 187].

Усогласеноста на методите и референтните вредности ќе придонесе и за континуиран и унифициран пристап во утврдувањето на АМО и следење на трендот на отпорноста на ниво на фарма, но и на национално и глобално ниво. Сличен пристап е дефиниран и во истражувањето на Aleksh M. O [191] и Tomazi T. et al. [184], каде се дава акцент на употребата на микродилуцискиот метод за утврдување на МИК и неговата дистрибуција за сметка на едноставната класификација на причинителите како осетливи или отпорни.

Од добиените резултати може да се воочи дека кај сите испитани причинители постои отпорност према tetracycline. Овој антибиотик е и најчесто употребуван во ветеринарната медицина, по В-лактамските антибиотици, и освен за маститис се применува и при терапија на други инфекции и патолошки состојби кај молзните крави (пнеумонија, дијареа, заостаната постелки и болести на чапунките). Отпорноста на пеницилинските антимикуробни лекови беше утврдена само кај *S.aureus*, но не на загајувачко ниво. Овој низок степен на отпорност на В-лактамските препарати може да се должи поради неприменување на антибактериско пресушување кое е задолжително се применува во високо развиените земји. [30, 129, 184]

Категоризацијата на еден изолат како сензитивен во *in vitro* одн. лабораториски услови не гарантира успешна терапија и во *in vivo*. Kasravi R. et al. [111] навел кои се можните причини за оваа состојба: а). недостаток на референтни вредности за категоризација на антимикуробните лекови во однос на специфичните причинители на маститис; б). одредени состојки на млекото кои можат потенцијално да ја намалат активноста на многу антибиотици (казеин, калциум, липиди и ендогени антимикуробни материји); в). недостаток на податоци за фармакодинамиката при ИММ апликација на антимикуробни лекови кај маститични крави; г). потенцијално штетно дејство на антимикуробните лекови врз одбрамбените механизми на МЖ; в). фреквенцијата на молзење која влијае на концентрацијата на антибиотиците на местото на инфекција во МЖ; г). како и разликите во степенот на размножување на бактериите во збогатен медиум *in vitro* и *in vivo* во млечната жлезда. Ова укажува дека со утврдување на АМО ќе добиеме увид кој антимикуробен лек не треба да го применуваме, а не значи дека осетливоста *in vivo* ќе биде поволна *in vitro*.

Во правец на намалување на АМО на бактериите на млечните фарми неопходно е:

- Примена на висок степен на биосигурносни мерки;
- Оптимизирање на употребата на антимицробните лекови;
- Зголемена примена на дијагностички алатки, вакцини и нови лекови;
- Подобрување на сфеста и разбирањето на АМО; и
- Редовни годишни надзори и контроли [106, 192].

7. ЗАКЛУЧОЦИ

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

- Во истражувањето е утврдена висока застапеност на СМ, каде 74% од кравите и 43% од четвртините беа позитивни на СМ
- Добиените резултати укажуваат дека само лимитот од 200.000 кл./мл не е идеална дијагностички алатка која со сигурност може да ги разликува инфицираните од неинфицираните четвртини.
- Лактококите се значаен етиолошки предизвикувач на СМ и треба да се користат подобрени дијагностички методи за нивно успешно идентификување.
- 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 идентификуваме причинителот.
- Добиените резултати од микробиолошките анализи укажуваат дека има изразено висок процент на усогласеност во наодите при единечно земање примерок со финалниот резултат од трикратното тестирање.
- Неопходна е интегрираност на микробиолошкиот наод и БСК, при дијагностицирање на СМ.
- Хигиенската оценка на МЖ меѓу 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. Висината на хигиенските оценки на останатите делови од телото, вклучително и бутот, е под влијание на менаџментот на фармата, конзистенцијата на изметот и зачестеноста на чистење на фармите.

- Резултати укажуваат кон што поскоро трансформирање на нашите фарми од врзан кон слободен систем на одгледување на молзните крави.
- Прикажаните истражувања донекаде даваат слични и очекувани податоци со оглед на тоа што МЖ и нозете се делови од телото што се постојано изложени на ѓубриво и се во корелација/зависност со СМ. За разлика од нив, нашето истражување не ја утврди таа поврзаност, и спротивно, се констатира позитивна статистичка значајност меѓу чистота на млечното огледало и застапеноста на СМ.
- Системот за молзење не е примарен фактор во појавата на хиперкератозата.
- 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 СМ.
- Сите четвртини од МЖ се подеднакво склони кон инфекција, и притоа не се забележаа статистички значителни отстапки кај ниту една четвртина во однос на четирите класификации (В, М, V и N) поврзани со БСК и ИМИ, како и соодносот на предни и задни четвртини.
- Неопходна е потребата од усогласеност на методите за утврдување на АМО, како и утврдување на референтни вредности за најчесто користените антимицробни лекови во млечната индустрија за специфичните предизвикувачи на маститис.
- MALDI-TOF MS претставува оптимална алатка за прелиминарна идентификација, особено во тријажните истражувања на фармите каде би се собрале голем број причинители и потребна е нивна брза, соодветна и евтина идентификација.

8. ПРЕПОРАКИ

- Од бактериолошки позитивните четвртини највисок процент на изолирани причинители се добиени од четвртини со БСК <200.000 кл./мл или 22%, 19% од четвртини со БСК од 200.000 до 400.000 кл./мл, и 10% во четвртините со БСК од 400.000 до 600.000 кл./мл. Што укажува на потреба, дека при ерадикација на СМ треба взаемно користење и на двете дијагностички алатки.
- Да не се занемаруваат лактококите како етиолошки агенс на СМ, туку да се применуваат соодветни алатки за нивна идентификација.
- 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 што при бактериолошкото тестирање би имале вредности на cfu >50/0.01ml би се прогласиле за позитивни, а за останатите четвртини би се препорачало континуирано следење на БСК.
- Утврдениот повисок БСК кај боските со R (3) и VR (4) степен, наспроти оние со N (1) и S (2) степен на хиперкератоза, потврдува дека хиперкератозата е ризик фактор во појавата на СМ и при селекција на молзни крави неминовен е детален морфолошки преглед на МЖ.
- Од добиените резултати на АМО каде се утврди највисок степен на отпорност на сите испитани причинители према tetracyclin се препорачува намалување на неговата примена во секојдневната пракса, и примена на антиминобни лекови од по нова генерација и со тесен антиминобен спектар.

- При врзан систем на одгледување како што најчесто имаме кај нас неминовно е зачестено чистење на лежиштата и примена на нова простирка, во намалување на застапеноста на СМ.
- При селекција на кравите неминовен е детален морфолошки преглед на МЖ во насока на пониска застапеност на СМ.

9. 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 R. M (2011), Mammary Gland/anatomy Encyclopedia of Dairy Sciences, Second Edition Vol.3, pp 328-337. San Diego.
4. Bath, D., Dickinson 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. Juozaitiene, 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 Riollet (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, Pillar 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 Zlezda, 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 nauchnih 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. Broucek, (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. J. Anim. Sci* Vol.24, No.3: 429-438. (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 Rodriguez (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 in 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.** Sanotharan, 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 Kompas, (2011), Clinical and epidemiological aspects of cow mastitis caused by staphylococcus aureus and its

methicillin-resistant, 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 značajza kvalitet i zdravstvenu ispravnost mleka, Zbornik naučnih radova, Vol. 13, br. 3-4, 65-71.

37. S. Hristov, Renata reljich (2004), Sprečavanje pojave i suzbijawe stafilokoknog mastitis krava, Zbornik naučnih 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 mlecne zlezde, (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 Veterinar med 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, Dirceia 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 Lämmner, 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. Corrêa, 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.
- 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. Bojković Kovačević S., N., Lazarević, (2009), Korelacija 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. Hristov S., Relić, R., Stanković, B., Vuković D., (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., 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. Fernandes A. M., Oliveira C. A. F, Tavolaro P., (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.** Forsback L., H. Lindmark-Mansson H., Andren A., 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.** Zdanowicz M., Shelford J. A., Tucker C. B., Weary D. B., 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.** Sant'Anna A. C., and Paranhos da Costa M. J. R., (2011) The relationship between dairy cow hygiene and somatic cell count in milk, *J.Dairy Sci.*94: 3835-3844.
- 96.** Schreiner D. A. and Ruegg P. L. (2003) Relationship between udder and leg hygiene scores and subclinical mastitis, *J. Dairy Sci.* 86: 3460-3465.
- 97.** Marcela de PinhoManzi, 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.** Neijenhuis F., Barkema H. W., Hogeveen H. and Noordhuizen J. P. T. M. (2001) Relationship between teat-end callosity and occurrence of clinical mastitis, *J. Dairy Sci.* 84: 2664:2672.
- 100.** Neijenhuis F., Barkema H. W., Hogeveen, H., and Noordhuizen J. P. T. M. (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.** McKeller Q. A., (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 Jankovič (2019) Antimikrobna rezistencija u veterinarskoj medicini: nastanak i značaj, Hrvatski veterinarski portal.

106. Meseko Clement, Makanju Olabisi, Ehizibolo David and Miraina Issa, (2019) Veterinary pharmaceuticals and antimicrobial resistance in developing countries, Intech Open Submitted: August 23rd 2018 .

107. Dalibor Todorović DVM, (2018), Karakterizacija mehanizma rezistencije na antibiotike i molekularna tipizacija izolata *Escherichia coli* poreklom od goveda i sinja, Doktorska disertacija, Fakultet za veterinarske medicini, 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. Хириш, 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 Nadaş, Nicodim Fit, Cosmina Bouari, Flore Chirila, Sorin Răpunţean, 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 VincoMedvid (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 PinhoManzi, Diego BorinNóbrega, Patrícia Yoshida Faccioli, Marcella Zampolli Troncarelli, Benedito Donizete Menozzi, HélioLangoni (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 bacteria, 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. Sztachańska, 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), Relationship 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 cows, *Veterinarni Medicina*, 58, (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.** Carne 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. Canniatti-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.
- 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. Dohoo I., S. Andersen, R. Dingwell, K. Hand, D. Kelton, K. Leslie, Y. Schukken, S.

Godden (2011), Diagnosing intramammary infections: Comparison of multiple versus single quarter milk samples for the identification of intramammary infections in lactating dairy cows, Journal of dairy science Pages 5515-5522.

162. Andersen S., Dohoo R., Olde Riekerink R., Stryhn H., 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 (2005). Association between hygiene scores and somatic scores in dairy cattle, JAVMA, Vol 227, No. 8.

164. Zurbrigg K., Kelton D., Anderson N., Millman S., (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. Murraya, Zerai 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. Asadpour R., Bagherniaee H., Houshmandzad M., H. Fatehi, A. Rafat, K. Nofouzi, K. Maftouni, (2012), Relationship between teat end hyperkeratosis with intra mammary 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, *TurkiyeKlinikleri 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. Guarin J. F., Baumberger C., and Ruegg P. L, (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, BAgrSc, PhD (2004), Effect of teat hyperkeratosis on somatic cell counts of dairy cows, *Intern J. Appl Res Vet Med*, vol 2, No. 2.
- 173.** Neijenhuis F., Barkema H. W., Hogeveen H., and Noordhuizen J. P. T. M. (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. Iyp, 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. Mahmmod, 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.

183. Mekonnen H., S. Workineh, M. Bayleyegn, A. Moges and K. Tadele (2005), Antimicrobial susceptibility profiles of mastitis isolates from cows in three major Ethiopian dairies, *Revue Méd Vét*, 156, 7, 391-394.

184. Tiago Tomazi, Gustavo Freu, Bruna Gomes Alves, Antonio Francisco de Souza Filho, Marcos Bryan Heinemann, Marcos Veiga dos Santos (2019), Genotyping and antimicrobial resistance of *Streptococcus uberis* isolated from bovine clinical mastitis, *PLoS ONE* 14 (10): e0223719.

185. Chaza Nazih Chehabi, Bettina Nonnemann, Lærke Boye Astrup, Michael Farre, and Karl Pedersen (2019), *Foodborne pathogens and disease*, Volume XX, Number XX, DOI: 10.1089/fpd.2018.2560.

186. Petra Leskovec, Darija Bendelja Ljoljić, Miroslav Benić, Antun Kostelić, Željko Cvetnić, Neven Antunac (2015), Osjetljivost izdvojenih uzročnika mastitisa prema antimikrobnim tvarima, Uzročnici mastitisa i antimikrobne tvari, *Mljekarstvo* 65 (3), 149-158, UDK: 637.055/579.678.

187. Saini V., J. T. McClure, D. Leger, G. P. Keefe, D. T. Scholl, D. W. Morck, and H. W. Berkema, (2012), Antimicrobial resistance profiles of common mastitis pathogens on Canadian dairy farms, *J. Dairy Sci.* 95 :4319–4332, [http://dx.doi.org/ 10.3168/jds.2012-5373](http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-5373).

188. Irena Klimienė, Modestas Ružauskas, Vytautas Špakauskas, Raimundas Mockeliūnas, Asta Pereckienė, Česlova Butrimaitė-Ambrozevičienė (2011), Prevalence

of gram positive bacteria in cow mastitis and their susceptibility to beta-lactam antibiotics, ISSN 1392-2130. Veterinarija ir zootechnika (Vet Med Zoot). T. 56 (78).

189. Tiago Tomazi, Antonio Francisco de Souza Filho, Marcos Bryan Heinemann, Marcos Veigados Santos, (2018), Molecular characterization and antimicrobial susceptibility pattern of *Streptococcus agalactiae* isolated from clinical mastitis in dairy cattle, PLoS ONE 13(6): e0199561.

190. T. Tomazi, F. M. Coura, J. L. Gonçalves, M. B. Heinemann and M. V. Santos (2018), Antimicrobial susceptibility patterns of *Escherichia coli* phylogenetic groups isolated from bovine clinical mastitis, J. DairySci. 101:1–13.

191. Aleksh M. O, K. M Al-Qudah, A. Al-Saleh (2014), Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens isolated from bovine mastitis in northern Jordan, Revue Méd. Vét., 2013, 164, 6, 319-326.

193. Clémence Boireau, Géraldine Cazeau, Nathalie Jarrige, Didier Calavas, Jean-Yves Madec, Agnès Leblond, Marisa Haenni, and Émilie Gay, (2018) Antimicrobial resistance in bacteria isolated from mastitis in dairy cattle in France, 2006-2016, J. Dairy Sci. 101:9451–9462.

БЛАГОДАРНОСТ

Во изработка на докторската дисертација неопходна беше подршката од многумина сораборници, каде јас бев само алатка која ќе ја реализира и прикаже пред јавноста. Оттука чувствувам оговорност, а воедно и задоволство да им изразам посебна благодарност на:

- ✓ Проф. д-р Дине Митров од Факултетот за ветеринарна медицина во Скопје кој како ментор 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.
- ✓ Благодарност до доц. д-р Искра Цветковиќ од Факултетот за Ветеринарна медицина во Скопје за нејзината постојана посветеност во изведбата на овој труд, бидејќи беше инволвирани во сите постапки при негова изработка.
- ✓ Доц. д-р. Мирослав Ќосевски од Факултетот за ветеринарна медицина во Скопје, каде секогаш давеше соодветни насоки и правци, имаше трпение да ги ислуша и спори моите тези, и беше постојано моја подршка во оваа истражувачка работа.
- ✓ Благодарност до проф. д-р Александар Димовски и м-р Сања Кипријановска од Истражувачкиот центар за генетско инженерство 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 и Лилјана Китанова од Институтот за храна при Факултет за ветеринарна медицина во Скопје, за континуирата соработа, како и конструктивната подршка.
- ✓ За помошта при собирање на примероците на млеко им се заблагодарувам на вет тех. Ангелче Тодоровски од Ветеринарната клиника „Про-инфовет“ - 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-Инфоваг”- 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 Мустафи ДВМ., Ветеринарна клиника „ Вет Градец” - Гостивар
- Златко Тековски ДВМ., од Ветеринарна клиника „Пела-вет”- Битола,
 - ✓ Огромна Благодарност до фармерите кој не себично дозволија нивните фарми да станат дел од ова истражување.
 - ✓ Благодарност до студентите при Факултетот за ветеринарна медицина – Скопје, Кристина Дојчиновска и Елена Митревска за помошта при комплетирањето на докторската дисертацијата.
 - ✓ Му се заблагодарувам на моето семејство, пред се на мојата сопруга Бијанка Тасевска за истрајноста при изработката на оваа докторска дисертација, како и за нејзината безусловната поддршка во овој целокупен процес.

Докторската дисертација ја посветувам на мојата ќерка Калина.