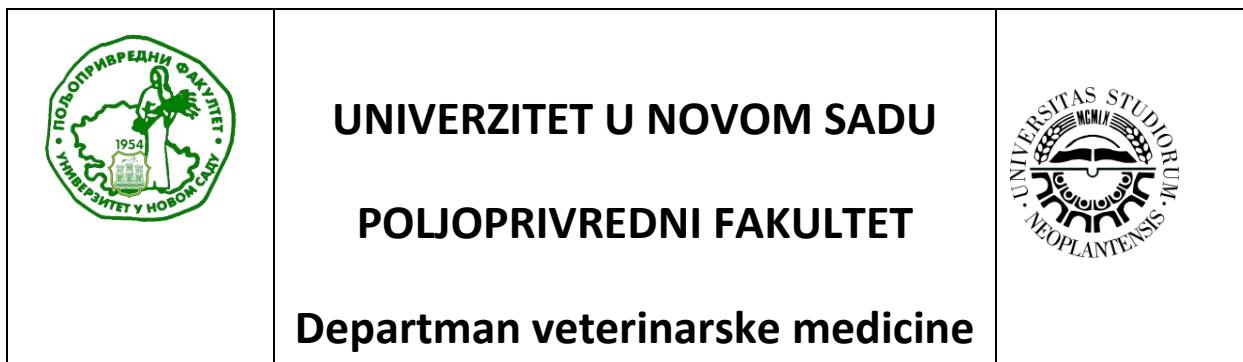


Student: Radovan Božičković, dipl.vet

GANGRENOZNI MASTITISI KRAVA

DIPLOMSKI-MASTER RAD

Novi Sad, 2014.god.



Kandidat:
Radovan Božičković, dipl.vet

Mentor:
Prof.dr Stanko Boboš

GANGRENOZNI MASTITISI KRAVA

DIPLOMSKI-MASTER RAD

Novi Sad, 2014.god.

Komisija za ocenu i odbranu master teze

Dr Stanko Boboš, redovni profesor, za užu naučnu oblast Bolesti životinja i higijena animalnih proizvoda, 2006., Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.

Dr Ivan Stančić, docent, za užu naučnu oblast Reprodukcija životinja, 2010., за ужу научну област Репродукција животиња, 2010., Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.

Dr Vesna Lalošević, redovni profesor, za užu naučnu oblast Mikrobiologija i zarazne bolesti, 2008., Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.

Sadržaj

1.0. Uvod

2.0. Pregled literature

2.1. Anatomija i fiziologija mlečne žlezde

 2.1.1. Anatomija mlečne žlezde

 2.1.2. Fiziologija mlečne žlezde

2.2. Fiziologija imunosti mlečne žlezde

2.3. Podela mastitisa

 2.3.2. Nespecifične upale vimena

2.4. Faktori koji dovode do mastitisa

2.5. Profilaksa i terapija mastitisa

 2.5.1. Profilaksa mastitisa

 2.5.2. Terapija mastitisa

 2.5.3. *Arcanobacterium pyogenes*

3.0. Cilj i zadaci istraživanja

4.0. Materijal i metode

5.0. Rezultati ispitivanja

6.0. Diskusija

7.0. Zaključci

8.0. Literatura

KRATAK SADRŽAJ

Zapaljenje mlečne žlezde, mastitisi preživara, predstavljaju jedan od najaktuelnijih problema u intenzivnoj proizvodnji mleka, koji nanosi velike ekonomske gubitke. Dugogodišnji različiti pristupi lečenju subkliničkih i kliničkih mastitisa nisu dali zadovoljavajuće rešenje, pa je problem mastitisa i dalje aktuelan. Sprečavanje prodora patogenog uzročnika u mlečnu žlezdu, njegovo naseljavanje i razmnožavanje, nameću stalnu potrebu za redovnim kontrolama mleka, kao i preuzimanje preventivnih i terapijskih mera u cilju smanjenja nastanka mastitisa.

Stafilocoke mogu u akutnoj formi da izazovu teške, maligne mastitise, u vidu granulomatoznih i nekrotičnih promena. Hronične forme stafilocoknog mastitisa uglavnom prolaze kao subklinički oblici obolenja mlečne žlezde. Najčešći prouzrokovači akutnog kataralnog mastitisa (*mastitis catarrhalis acuta*) su streptokoke (*Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* i *Streptococcus uberis*), ređe drugi mikroorganizmi. Javlja se neposredno posle telenja u periodu najveće mlečnosti. Ovi mikroorganizmi tokom vremena dovode do prestanka sinteze mleka. Stafilocoke, kao i streptokoke, su veoma slabi antigeni, što dodatno otežava pronalažak efikasne vakcine. Iz tih razloga još uvek nije pronađena komercijalna efikasna vakcina protiv mastitisa izazvanih bakterijama *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus agalactiae*, ali primena autohtonih vakcina u preveniranju mastitisa može dati zadovoljavajuće rezultate.

SUMMARY

Inflammation of the mammary gland, mastitis in ruminants, are one of the most pressing problems in intensive milk production, causing great economic losses. For many years various approaches to treatment of subclinical and clinical mastitis did not give a satisfactory solution, so the problem of mastitis is still present. Prevent the infiltration of pathogenic agents into the mammary gland, its settlement and growth, impose a constant need for regular inspections of milk, as well as preventive and therapeutic measures to reduce the occurrence of mastitis.

Staphylococci can cause an acute, severe, and malignant form of granulomatous mastitis with necrotic changes. Chronic cases of staphylococcal mastitis often go as subclinical forms of diseases of the mammary gland. The most frequent causes of acute catarrhal mastitis (mastitis catarrhalis acuta) are streptococcus (*Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis*), rarely other microorganisms. It occurs immediately after calving, in period of largest milk production. These microorganisms over time lead to the cessation of milk synthesis. Staphylococci and streptococci are very weak antigens, which further complicates finding of effective vaccines. For these reasons an effective commercial vaccine against mastitis caused by *S. aureus* and *Str. agalactiae* still not found, but the application of indigenous vaccine in prevention of mastitis may be sufficient.

1.0. UVOD

Mastitis predstavlja veliki ekonomski i zdravstveni problem u zapatima preživara. Dugogodišnji različiti pristupi lečenja mastitisa nisu dali adekvatno rešenje, pa je problem mastitisa i dalje prisutan i aktuelan. Lečenje mastitisa antibioticima daje zadovoljavajuće rezultate, ali ono sa sobom nosi troškove u lečenju i odbacivanju mleka. Iz svih navedenih razloga, mogućnost iznalaženja novih rešenja stalno prisutnog problema mastitisa se ogleda u novoj oblasti naučnog ispitivanja, a to je imunoprofilaksa. Dosadašnje vakcine protiv mastitisa su još uvek nedovoljno efikasne u široj praksi i na nivou su eksperimentalnih vakcina. Sve stajske vakcine na kojima se do sada radilo, pokazuju značajan eksperimentalni uspeh. Taj uspeh se ogleda u značajnom povećanju titra antitela u serumu (ali ne i u mleku), kao i u smanjenju pojave kliničkih i supkliničkih mastitisa među oglednim i kontrolnim životinjama. Ipak se i dalje smatra da je imunoprofilaksa kao jedan od metoda prevencije zapaljenja vimena i pojave mastitisa, još uvek nedovoljno istraženo polje naučnog rada. Mnogi naučnici se bave problematikom pravljenja vakcina protiv mastitisa, ali složenost same mlečne žlezde, kao i specifična propustljivost barijere krv-mleko, smanjuje uspešnost ovih napora.

2.0. PREGLED LITERATURE

2.1. Anatomija i fiziologija mlečne žlezde

2.1.1. Anatomija mlečne žlezde

Mlečna žlezda (glandula lactifera) ili vime (mamma, uber, mastos) je modifikovana kožna, znojna, tubuloalveolarna žlezda lobularne građe. Spada u grupu kožnih klupčastih-glomiformnih žlezda apokrinog tipa. Karakteristično biološko i klasno obeležje sisara (Mammalia) i njena primarna uloga je u ishrani novorođenčadi. Vime je uglavnom mlečna žlezda ženskih životinja (mamma femina seu feminine), ali kao rudiment zajedno sa odgovarajućim brojem sisa javlja se i kod muških životinja (mamma masculine) - lažne ili pseudo sise. Kod krava ona je dvogubo bilateralno simetrična žlezda, nalazi se na ventralnom delu trbušnog zida u ingvinalnoj regiji manje ili više između zadnjih ekstremiteta. Vime krava čini četiri mamarna kompleksa, kod ovaca su to dva mamarna kompleksa, koji se sastoje od **žlezdanog tela** (corpus mammae) i **sise** (papilla mammae) a u oba dela se nalazi zajednički sistem kanala.

Mlečna žlezda podeljena je na levu i desnu polovicu. Levu i desnu polovicu čine po dva mamarna kompleksa kod krava, dok kod ovaca levu i desnu polovicu čine po jedan mamarni kompleks. Jedan mamarni kompleks kod krava odgovara jednoj četvrtini vimena, te se razlikuju dve prednje (leva i desna) i dve zadnje (leva i desna) četvrtine. Zadnje četvrtine čine oko 55-60% ukupne mase vimena. Prednje sise su duže od zadnjih i njihova dužina je 7-9 cm, a zadnjih je 5-7 cm. Ovi mamarni kompleksi međusobno ne komuniciraju, tako da se zapaljenjski procesi desnog kompleksa ne može preneti na levi.

Spolja, vime je obavijeno mekanom, elastičnom i pomicnom kožom, koja je prekrivena sitnim i nežnim dlakama. Osnovna uloga kože je da prekriva vime i da štiti unutrašnjost mlečne žlezde. Sa unutrašnje strane telo vimena je podeljeno medijalnim žljebom- *sulcus intramammarius* na levu i desnu polovicu vimena. Ispod kože vime je obavijeno dosta labavom i rastresitom **površinskom fascijom** (fascia superficialis) predstavlja nastavak površinske fascije trupa, a **duboka fascija** (fascia profunda) odvaja se od duboke fascije trupa(fascia flave abdominis), u blizini bele linije (linea alba) i obavija vime ispod površinske fascije. Duboka fascija prodire medijalno u vime i deli ga na dve polovine, obavija ga sa strane i predstavlja *ligamentum suspensorius uberis*. Fascije služe da fiksiraju vime, a sa

njima to čini i *ligamentum suspensorium*. Fibroelastično tkivo levog i desnog ligamenta onemogućava istezanje kada je mlečna žlezda ispunjena mlekom.

Suspenzorni sistem vimena- apparatus suspensorius mammarius je baziran na dobroj povezanosti žlezde za telo jedinke i čine ga dve grupe ligamenata- medijalni i lateralni suspenzorni ligament. **Medijalni suspenzorni ligament** je najvažniji deo suspenzornog sistema krava. Izgradjen je od vezivnog tkiva koje potiče od abdominalnog zida i koje se povezuje za medijalnu ravnu površinu dveju polovina vimena. Medijalni suspenzorni ligament ima veliku vučnu snagu, on je takođe sposoban da se istegne onda kada se žlezda puni mlekom i tako omogućava povećanje težine mlečne žlezde. Oštećenje ovog ligamenta vodi istezanju vimena i većoj predispoziciji za nastanak povreda, posebno sisa. **Lateralni suspenzorni ligament** sadrži više kolagena nego elastina i oblaže vime sa spoljašnje strane. Ispod duboke fascije trupa nalazi se kapsula, koja se sastoji iz vezivnog tkiva, koja sadrži elastična i kolagena vlakna, misicno i dosta masnog tkiva. Vezivnotkivna kapsula se sastoji od **intersticijuma** - međuprostornog tkiva i **parenhima** - žlezdanog tkiva. Od kapsule polaze i pružaju se unutar, u parenhim mlečnih žlezde vezivno tkivne pregrade - **septa**, te pregrade predstavljaju ujedno i intersticijum mlečnih žlezda, koji deli parenhim mlečnih žlezda na režnjiće - **lobuli**. Od ovih pregrada - **septa** odvaja se intersticijum i obavlja svuda unaokolo žlezdane alveole, odnosno acinuse, tako da i njih pregrađuje. Kroz vezivnotkivne pregrade, odnosno intersticijum pružaju se krvni i limfni sudovi, nervna vlakna, manji i veći kanalići - **tubuli**. Kod nekih životinja intersticijum je jače, a kod nekih slabije razvijen, što zavisi od rase, konstitucije, ishrane i starosti životinje i kod starijih je uvek jače razvijen. Kod mesnatog vimena intersticijum je jače razvijen u odnosu na parenhim, pa sekrecija mleka nije obilna. Između intersticijuma je parenhim vimena. Najjače je razvijen u odnosu na druge strukturne delove vimena u punom stadijumu laktacije i sastoji se iz sitnih razgranatih kanalića, koji se šire u sekretorne meškove - **alveole**, koje se sastoje od jednog sloja epitelnih ćelija, koji leže na bazalnoj membrani. Između epitelnih ćelija i basalne membrane su **mioepitelne ćelije**, specijalizovane mišićne ćelije koje se pod dejstvom oksicotina, koji se sintetiše u neurosekretivnim ćelijama hipotalamus, kontrakuju i posledično dovode do pojačanog lučenja mleka u alveole. Epitel mlečnih alveola je niskoprizmatičan u acinusima koji su relativno neaktivni, a u toku aktivnosti, odnosno sinteze mleka je visokoprizmatičan, a apikalna površina citoplazme štrče u lumen alveola. U toku aktivne sekrecije, deo membrane sa jednim delo, citoplazme sa apikalnog dela ćelije odpadne u lumen alveola, ovaj način lučenja predstavlja **apokrini tip sekrecije**. Alveole imaju odvodne kanaliće - **ductuli lactiferi**, koji su položeni intralobularno. Međusobno se udružuju i formiraju veće kanale – **ductus lactiferi**, koji su položeni interlobularno. Ductus lactiferi uvire u mlečnu cisternu – **sinus lactiferi**. Iz cisterne izlazi jedan ili više kanala, koji vode kroz sisu – sisni kanal – **ductus papillaris**. Oni se završavaju malim otvorom na vrhu sise – **ostia papillaria**, kroz koje prilikom muže ili sisanja mleko dospeva u spoljašnju sredinu.

Sise vimena preživara – **papilla mammae** su valjkaste i slabo nagnutne u ventrokranijalnom pravcu. Na sisama krava nema dlaka, kao ni znojnih ni lojnih žlezda. Velicina i oblik sisa zavisi od oblika i veličine vimena kao i proizvodnje mleka. Kod krava, prednje sise uglavnom duže od zadnjih. Imaju samo jedan izvodni kanal – **ductus papillaris**,

sa jednim otvorom – **ostium papillae**. Sisni kanal je glavna barijera infekcijama, koji se zatvara pomoću **m.sphincter** koji obavlja kanal i ne dozvoljava da mleko slobodno curi u spoljašnju sredinu. Firstenbergova rozeta – **Furstenberg's Rosette** predstavlja mišićni sloj koji se nalazi u unutrašnjosti sisnog kanala, koji može da se izvrne u kanal kada se on otvori u momentu prepunjenošću vimena mlekom, što može da bude glavni razlog prodora leukocita iz sisnog kanala u cisternu. Krikoidni prstenovi – **Annular folds** markiraju proksimalni deo sisne cisterne i ujedno predstavljaju granicu između sisne i žlezdane cisterne.

Žlezdano telo – **corpus mammae** sastoji se od žlezdanog epitela – **glandula mammaria** organizovano u obliku režnjeva – **lobusa**, koji su građeni od nekoliko režnjića – **lobulusa** kapsulirani vezivnim tkivom.

Cisterna žlezde – **sinus lactiferus** predstavlja nastavak žlezdane cisterne. U svaku cisternu uliva se od 8-12 kanala koji dovode mleko iz žlezdanog tkiva, a funkcija cisterne je doponija mleka.

Vaskularizacija mlečne žlezde – krv koja dospeva u mlečnu žlezdu je veoma značajan za njenu funkciju, jer svi prekursori mleka vode poreklo iz krvi. Ukupan volumen krvi kod krava u laktaciji je oko 8% od ukupne zapremine krvi tela, dok kod krava koje nisu u laktaciji oko 7,4%. Smanjenje produkcije sa napredovanjem laktacije nije u tonu sa smanjenja protoka krvi.

Arterijski sistem – krv napušta srce i teče ka zadnjoj polovini tela (kaudalno) abdominalnom aortom. Kada dođe do regio pubis prolazi u *Aa. iliaca communis* od kojih se odvajaju *Aa. iliaca externae et Aa. iliaca internae*. *A. iliaca externa* zatim postaje *A. femoralis*, a od *A. femoralis* se odvaja *A. prepubica* od koje se grana *A. abdominalis posterior et pudenda externa*. Kada *A. pudenda* napusti šupljinu tela, postaje *A. mammaria* (oko 1 cm prečnika). *A. mammariae* se dalje grana na *A. mammaria anterior cranialis et A. mammaria posterior caudalis* koje se dalje nishodno granaju u žlezde. Mala količina krvi dospeva u mlečnu žlezdu i preko *A. perinealis* (koja nastaje od *A. iliaca interna*) ali samo u dorzo-kaudalni deo žlezde.

Venski sistem – vene napuštaju mlečnu žlezdu ne paralelno sa arterijama. postoje tri vene sa svake strane koje nose krv iz žlezde:

1. *V. pudenda externa* napušta aparalelno sa *A. pudenda externa*
2. *V. subcutis abdominalis* napušta žlezdu na gornjem kraju prednjih četvrtina i prolazi duž abdominalnog zida.
3. *V. perinealis* napušta zadnji deo žlezde paralelno sa *A. perinealis*

Venzni krug nastaje od anastamoze između anteriornih i posteriornih mamarnih vena. Sprečava priklještenje krvnih sudova kada krava leži.

Limfni sistem – mlečna žlezda poseduje bogatu mrežu limfnih sudova. U vimenu, skoro celi limfni sistem protiče kroz *Lnn. supramammari*. Unutar žlezde ucestali su pomoćni limfni čvorovi, a često ispod kože se nalaze superficialni limfni čvorovi.

Nervni sistem – inervaciju vima vrše ogranci *plexus lumbalisa*, uglavnom *N. sepmaticus externus*, delimično *Nn. ilioinguinalis* i *Nn. iliohypogastrica*.

2.1.2. Fiziologija mlečne žlezde

Po rođenju u prvim mesecima vime raste istom brzinom kao i telo – **izometrični rast**, a brži rast vima u odnosu na telo počinje u uzrastu od 2 do 3 meseca – **alometričan rast** kada proliferiše masno tkivo i kanali koji se u njemu granaju. U toku prvog graviditeta mlečna žlezda se intezivnije razvija, a na kraju bremenitosti se učešće vezivnog i masnog tkiva smanjuje na 40%, a tabulo-alveoplarni sistem i alveolarne šupljine zauzimaju 60% (Harrison i sar., 1993).

Začeci formiranja mlečnih žlezda uočava se već u embrionalnom periodu u vidu pupoljka pokožica u vezivu (krznu). Jedan deo pupoljka ostaje povezan sa potkožicom, a onaj dublje u vezivu se može granati u više grana. Ove grane postepeno formiraju šupljine i pretvaraju se u kanaliće sa dvoslojnim niskoprizmatičnim epitelom. Od dela povezanog sa površinom pokožice formira se mali začetak bradavice/sise. Faktori koji utiču na razviće mlečne žlezde u toku intrauterinog perioda razvića još nisu potpuno poznati ali izgleda da se početni deo odvija bez uticaja hormona, a kasnije faza razvića se odvija pod uticajem hormona. Ovo je važno jer se nepravilnosti u razviću mlečne žlezde mogu javiti i ako se majke tretiraju sa hormonima tokom graviditeta. Kod domaćih životinja puno razviće mlečne žlezde nastaje pri kraju graviditeta, a odvija se pod uticajem polnih hormona estrogena i progesterona u tom periodu poreklom, najvećim delom iz placente. Estrogeni podstiču razvoj sistema žlezdanih kanalića koji dobijaju veoma razgranat oblik. Progesteron utiče na razvoj sekretornih ćelija u sastavu parenhima i alveola. Kada dođe do porođaja mlečna žlezda je u potpunosti razvijena i sposobna za funkciju, a to je lučenje mleka za ishranu mладунaca. Polni hormoni ženke utiču na razvoj mlečnih žlezda i pripremaju je za obavljanje funkcije, ali one ne utiču na početak laktacije i njeno održavanje. Sekreciju mleka pokreće i održava hormon prednjeg režnja hipofize – prolaktin. Pored polnih hormona i prolaktina i drugi hormoni su veoma važni za pravilan razvoj i funkciju mlečne žlezde. Na prvom mestu se ubraja hormon rasta i hormoni tireoidne žlezde, međutim, ništa manji značaj imaju insulin, hormoni nadbubrege, gonadostimulini i dr. Estrogeni, sami, ili u kombinaciji sa progesteronom, mogu izazvati povećanje parenhima mlečne žlezde ali je za potpuno razviće neophodno i delovanje adenohipofize, pa i nadbubrege. Lučenje mleka počinje već pred sam kraj graviditeta (krave nekad treba izmuzati pre teljenja da bi se smanjio pritisak u vimenu), a u drugih u vreme i posle porođaja. To prvo mleko se razlikuje po sastavu od običnog i naziva se *kolostrum*. Smatra se da se kontrola lučenja mleka odvija hormonalnim, a ne nervnim putem. Početak lučenja u vreme graviditeta oko porođaja izgleda da je vezan za pad koncentracije progesterona, koji za vreme graviditeta koči direktno delovanje prolaktina i laktogena placente na žlezdane ćelije u mlečnoj žlezdi. Izlučivanje mleka iz mlečne žlezde je refleksni čin koji se odvija pod uticajem određenih stimulansa i to preko CNS. Od receptora sa

afferentnim vlaknima impulsi prenose preko kičmene moždine do hipotalamus, koji posreduje u oslobođanju oksitocina iz zadnjeg režnja hipofize. Oksitocin putem krvi dospeva do mlečne žlezde gde deluje na mioepitelne ćelije i one pomažu u istiskivanju mleka iz acinusa, čime se povećava pritisak unutar mlečne žlezde. Delovanje oksicotina traje samo nekoliko minuta od 6 do 8 minuta (Marković, 1980). Ovaj refleks može biti uslovan, tako da aktom sisanja ili muže može da se izazove lučenje mleka.

2.2. Fiziologija imunosti mlečne žlezde

U poslednje vreme velika važnost se pridaje prirodnim odbrambenim sposobnostima mlečne žlezde. U nespecifične odbrambene mehanizme možemo svrstati prirodnu barijeru, koju čine anatomsko pravilno razvijeno vime i sisa, epitel sisnog kanala, Firstenbergova rozeta, kao i faktori rezistencije čitavog organizma (kondicija, konstitucija). Ove nespecifične faktore možemo nazvati "prvom linijom" odbrane mlečne žlezde od mikroorganizama. Kada mikroorganizmi prođu ovu liniju odbrane i prodru u cisternu sreću se sa "drugom linijom" odbrane mlečne žlezde, koju sačinjavaju somatske ćelije u mleku, lizozim, laktoperin, komplement - nazvani jednim imenom laktogeni i imunoglobulini koji su odgovorni za specifičan imunološki odgovor. Prirodni odbrambeni sistem u mlečnoj žlezdi se bazira na četiri mehanizma (Leitner, 2000; Stojić, 2001):

1. fizička zaštita, koju čini intaktna koja vimena;
2. fizičko-hemijska zaštita, koju čini keratin sa svojim antibakteričkim dejstvom;
3. nespecifični imunološki odgovor sa aktivacijom zapaljenske reakcije i
4. specifični imunološki odgovor koji uključuje aktivaciju imunocita.

Jedan od faktora koji doprinosi sniženju rizika od bakterijske kontaminacije vimena je svakako zdrava i neoštećena koža vimena, a posebno na papilama – sisama. *Stratum corneum* zdrave kože vimena je barijera za prođor vode sa površine ka unutrašnjosti, kao i za gubitak tečnosti iz tkiva. Utvrđeno je da ako procenat vode u orožalom epitelu opadne ispod 10% dolazi do njegovog pucanja (Blank i sar., 1953) i tada može da dođe do gubljenja zaštitnih kiselih materija kože, među koje spadaju mlečna kiselina, slobodne masne kiseline i aminokiseline (Raab, 1990). Ove promene u epitelu kože pogoduju razmnožavanju patogenih bakterija (*S. aureus*) na papilama, a time i mogućnost nastanka intramamarne infekcije (Pankey i sar., 1984). Smatra se da anatomski pravilno razvijeno vime i sise smanjuju mogućnost pojave mastitisa. Pod tim se podrazumeva pravilan oblik vimena, kao i veličina sisa i sisnog kanala. Nije poželjno da se u eksploraciju uključuju životinje sa pasisama ili nepravilnim oblikom sisa i sisnog kanala, jer to povećava rizik od nastanka mastitisa. Sisni kanal je prosečno dugačak oko 10 mm (3-18 mm), a prečnik mu iznosi 2 mm (Hamann,

2000). U zidu sisnog kanala nalazi se sfinkter od glatko-mišićnog tkiva, koji u periodu između dve muže zatvara sisni otvor. Ustanovljen je veći procenat infekcija kod životinja sa većom prohodnošću kanala. Redovnom mužom, tj. efektom ispiranja se može smanjiti broj mikroorganizama koji su naselili sisni kanal. Sisni kanal je iznutra obložen višeslojnim epitelom (*stratum granulosum, stratum corneum*) koji je relativno deblji u odnosu na ostale delove kože goveda. *Stratum corneum* odgovara sloju keratina koji zatvara lumen kanala između dve muže. Količina keratina u sisnom kanalu kreće se u proseku oko 7 mg (2-14 mg). Keratin u sisnom kanalu bogat je esterifikovanim i neesterifikovanim masnim kiselinama, a posebno palmito-oleinskom i linoleinskom kiselinom, koje imaju snaćan antimikrobni efekat. Keratin predstavlja mehaničku barijeru u sisnom kanalu, posebno u periodu zasušenja. Iz keratina su izolovani katjonski proteini, kao što je ubikvitin, koji inhibira rast *Streptococcus agalactiae* i *Staphylococcus aureus*. Smatra se da se ovaj protein, koji je pozitivno nanelektrisan, vezuje za negativno nanelektrisan zid mikroorganizama i dovodi do poremećaja u osmotskoj regulaciji sa pojavom prodora tečnosti i citolize (Nickerson, 1985). Mleko sadrži supstance koje inhibitorno deluju na sakupljanje i razmnožavanje bakterija, koje jednim imenom zovemo lakenini. Naziv lakenini odnosi se na komplement, lizozim, laktoferin i laktoperoksidazu (Tizard, 1996). U mleku zdravih četvrti nalazi se veoma mala količina komponenti sistema komplementa. Komplement je sistem koji se sastoji od proteinskih komponenti (C1-C9) i zajedno sa antitelima predstavlja element humorалног imunološkog sistema (Rainard i sar., 1995). Komplement je nespecifičan faktor imunološke odbrane i njegova aktivnost je usmerena na biološke membrane, što ima za krajnji cilj njihovo oštećenje (Mihajlović, 1983). Pored toga, aktivisanje komponenti komplementa pobuđuje neke vrste ćelija (mastocite) da izlučuju biološki aktivne supstance (histamine), a hemotaksičnim uticajem privlače fagocite, omogućavaju opsonizaciju i deluju flogistično. Komponenta C5a sistema komplementa je stimulator aktivnosti polimorfonukleara i deluje kao faktor pozitivne hemotaksije, privlačeći neutrofile na mesto prodora bakterija (Schuster i sar., 1997). Jedan od stalnih sastojaka mleka je lizozim. Poznato je da se lizozim nalazi u telesnim tečnostima, kao što je pljuvačka, na površini sluzokože nosne šupljine i digestivnog trakta, kao i u mleku. Lizozim je bazni protein opisan još od strane Fleminga 1922. godine, a svoje baktericidno dejstvo ispoljava tako što cepta veze između N-acetil glukozamina i N-acetil muraminske kiseline u kompleksu mukoproteina ćelijskog zida bakterija (Tizard, 1996). Koncentracija lizozima u mleku je niska (0,13 mg/100ml) ali se ona povećava za vreme infekcije. Veliki broj radova ukazuju da krave sa niskom koncentracijom lizozima u mleku oboljevaju u većem procentu od mastitisa, što ukazuje da količina i nivo ovog proteina u mleku može biti pokazatelj predispozicije te jedinke za pojavu mastitisa (Nickerson, 1985). Gram pozitivne bakterije su uopšte osetljivije na lizozim, zato što imaju mnogo jednostavniji ćelijski zid, koji sadrži više od 90% peptidoglukana. Neke bakterije, kao što su stafilocoke, sadrže tajhonsku kiselinu i druge komponente, koje vezuju lizozim i sprečavaju difuziju do njegovog supstrata (Bojanić, 2000). Laktoferin je glikoprotein mleka koji konkuriše bakterijama vezujući za sebe gvožđe, i tako ga čini nedostupnim za bakterije (*E. coli, S. aureus*), kojima je on jedan od osnovnih elemenata za metabolizam i razmnožavanje. Laktoferin sintetišu neutrofilni granulociti, makrofagi i epitelne ćelije vimena (Harmon, 1980). Količina laktoferina u mleku krava varira od 0,02-0,035 mg/ml, u zavisnosti od vremena laktacije. Glavna funkcija laktoferina je da zaštititi mlečnu žlezdu od infekcije koliformnim mikroorganizmima, posebno

u fazi involucije, aktivacijom fagocitoze i sistema komplementa. Pored bakteriostatskog dejstva, lakoferin ima sposobnost da zaštitи parenhim mlečne žlezde od štetnog delovanja slobodnih radikala kiseonika (Legrand, 2004). Njegovu bakteriostatsku aktivnost inhibira citrat, koji se nalazi u mleku i kolostrumu, u znatno višoj koncentraciji od lakoferina. Aktivnost lakoferina najveća je u periodu zasušenja, kada njegova koncentracija u sekretu mlečne žlezde iznosi 20-100 mg/ml. Istovremeno je koncentracija citrata smanjena, dok je koncentracija bikarbonata povećana (Legrand, 2004). Koncentracija lakoferina počinje da raste 2-4 dana od prestanka muže i linearno se povećava u toku perioda zasušenja, kao posledica povećane neto sinteze lakoferina u periodu involucije vimena. Istraživanja Olivera i saradnika iz 2000. godine ukazuju da lakoferin može da deluje kao stimulator procesa fagocitoze bakterija i omogućava njihovo uklanjanje iz vimena. U mleku se pored lakoferina nalazi i transferin, protein koji takođe za sebe vezuje gvožđe. Za razliku od mleka glodara i kunića, u mleku krava je koncentracija transferina veoma niska (1mg/ml u kolostrumu, 0,02-0,04 mg/ml u mleku, 4-5 mg/ml u krvnom serumu) (Sanchez, 1988). Transferin se ne sintetiše u vimenu krava, već prelazi u mleko iz krvi putem transritoze. U toku mastitisa, njegova koncentracija u mleku se povećava, prateći porast albumina i dostiže 1 mg/ml kod mastitisa izazvanog sa *E. coli* (Reinard, 1983). Mleko sadrži visoku koncentraciju laktoperoksidaze i jona tiocijanata (SCN⁻). Tiocijanat se takođe nalazi u mleku, posebno kod krava koje sa hranom unose dosta leguminoza, dok se vodonik-peroksid može dobiti kako of neutrofilnih granulocita, tako i od samih mikroorganizama (streptokoke). Laktoperoksidaza se nalazi i u epitelu mlečne žlezde, u koncentraciji od 2-35 mg/ml, a tiocijanat potiče iz zelenih hraniva koje sadrže tiocijanatne prekusore (1-10 ppm) (Nickerson, 1985). Enzim ksantin oksidaza iz opne micela mlečne masti, katalizuje stvaranje azot oksida od neorganskog nitrita, koji u aerobnim uslovima dovodi do nastanka peroksinitrita sa snažnim baktericidnim dejstvom.

U mleku krava, u fiziološkim uslovima, stalno se nalaze različiti tipovi ćelija: neutrofilni granulociti (polimorfonuklearni granulociti, PMNL), limfociti, eozinofili, makrofagi i epitelne ćelije (Pillai, 2001). Ovaj ćelijski sadržaj je poznat pod nazivom "somatske ćelije u mleku" (SCC, *milk somatic cells*). Broj ovih ćelija u mleku zdravih krava kreće se od 160-450 x 10³/ml, a prema kriterijumima međunarodne mlekarske federacije, granična vrednost broja ćelija u 1 ml mleka zdravih krava iznosi 500 x 10³/ml (Schalm, 1971). Na početku laktacije, broj somatskih ćelija može da se kreće i do 2.500.000 ćelija u ml (Frerking, 1961). Diferencijalna bela krvna slika u mleku zdravih četvrti pokazuje najveći procenat polimorfonukleara, zatim makrofaga i limfocita. U toku zasušenja, najčešći tip ćelija u mleku su makrofagi, dok kolostrum pokazuje porast polimorfonuklearnih leukocita (PMNL), kao i kod svih infekcija mlečne žlezde. U većini uzoraka mleka mogu se naći ćelije sekretornog epitelia vimena (Lee, 1980). U mleku se mogu naći najčešće tri različite kategorije ćelija. Polimorfonuklearni leukociti - neutrofilni granulociti su najčešće ćelije koje se mogu naći u mleku, sa jedrima od 2 do 5 segmenata. Veličina im varira od 9 do 15 µm. Mleko najviše sadrži neutrofilnih granulocita, a zatim eozinofilnih i najmanje bazofilnih garnulocita (Miljković, 1992). Monociti bez lipidnih inkluzija se karakterišu promenljivim i nejasnim oblikom nukleusa sa difuznim hromatinom. Epitelne ćelije potiču iz kanalnog sistema mlečne žlezde. Veoma često se mogu naći tesno priljubljene jedna uz drugu ili u skupini. Jedro je tamno obojeno i može biti različitog oblika i veličine, sferično, eliptično i slično, što zavisi iz

kog dela kanala potiču (Lee, 1980). Ove ćelije spadaju u najkrupnije ćelije mleka i njihova veličina iznosi 55 µm. Vrsta i broj ćelija u mleku se menjaju u zavisnosti od fiziološkog stanja organizma. Najveći uticaj ima stadijum laktacije. Kolostralno mleko sadrži više miliona ćelija. Na broj ćelija utiče i pojava estrusa, kada se broj ćelija znatno povećava. Sadržaj ćelija je uvek veći na kraju muže, nego na početku. Nepotpuna muža, promena vremena, hrana, način držanja i mnogi drugi činioci mogu da dovedu do povećanja broja ćelija (Miljković, 1992; Campos i sar., 1993; Nickerson, 1985). Ukoliko se bakterije ne eliminišu, u kratkom vremenskom roku dolazi do odgovora akutne faze i akutnog zapaljenja, kao nespecifičnog imunološkog odgovora. Citokini su supstance proteinske prirode koje imaju ulogu sličnu hormonima, regulišu lokalnu zapaljenu reakciju, a putem cirkulacije mogu dospeti do udaljenih organa i izazvati sistemsku reakciju. U kaskadnoj reakciji odgovora akutne faze, citokini se luče od strane stimulirajućih makrofaga, a to su: interferon- β (IFN- β), interleukin (IL-1), IL-6, IL-8, tumor nekrotični factor- α (TNF- α) i ostali faktori nespecifičnog imunološkog odgovora (Burvenich i sar., 2000). Limfociti u mleku i tkivu mlečne žlezde su druga linija odbrane imunološkog sistema vimena.

2.3. Podela Mastitisa

Zapaljenje vimena ili mastitis kod krava je akutna ili hronična upala izvodnih kanala, parenhima ili intersticijuma jedne ili više mlečnih žlezda koje grade vime krava. Simptomi mogu imati formu klinički manifestovanog mastitisa (može se ustanoviti ispitivanjem čula) sa raširenošću 1-3%, ili subkliničkog mastitisa (može se ustanoviti isključivo laboratorijskim pregledom mleka) sa raširenošću više od 30 %. Dijagnostika kliničkih mastitisa ne predstavlja problem budući da u tim slučajevima dolazi do otoka, temperiranosti, bola i induracije u mlečnoj žlezdi, kao i promena u mleku. Mleko se može promeniti u konzistenciji i boji, tada se u mleku primećuje prisustvo krpica, tragova gnoja, krvi ili boja mleka odgovara boji piva, a dijagnoza se postavlja palpacijom i pregledom prvih mlazeva mleka. U slučajevima subkliničkog mastitisa ne zapažaju se klinički vidljive promene na mlečnoj žlezdi, već samo u mleku. tako da se za otkrivanje subkliničkih mastitisa koriste metode zasnovane na merenju promene u mleku, a to su najčešće metode koje određuju broj leukocita u mleku. Tako da je praktično subklinički mastitis nevidljiv.

Mastitis se po toku može podeliti na perakutni, akutni, subakutni i hronični. Na osnovu kliničko-patološke slike tok oboljenja delimo na kataralne (zapaljenjem zahvaćeni sisni kanal i cisterna), intersticijalne (zahvaćeno vezivno tkivo mlečne žlezde), parenhimatozne (zahvaćen žlezdani deo vimena).

Mastitise još možemo podeliti i na osnovu mikroorganizama koji izazivaju zapaljenske procese i koji se nalaze u mleku, odnosno na osnovu izazivača mastitisa-etiologije:

1. Specifični:

Specifično patogeni:

- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus agalactiae*
- *Streptococcus dysgalactiae*
- *Streptococcus uberis*
- Koliformni mikroorganizmi *E. coli*, *Proteus sp.*, *Klebsiella sp.*
- *Arcanobacter pyogenes*
- *Pseudomonas aeruginosa*

Uslovno saprofitski:

- *Corynobacterium bovis*
- Nehemolitične mikrokokе

2. Nespecifični:

- aktinomikoza
- botriomikoza
- tuberkuloza
- nagaz
- *Listeria sp.*
- *Leptospira sp.*
- *Salmonella sp.*
- *Pneumococcus sp.*
- *Brucella sp.*
- Gljivice: *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*

- *Alge, Protheca sp.*
- PPLO, rikecije, mikoplazme

2.3.1. Nespecifične promene upale vimena

Akutni kataralni mastitis – Mastitis catarrhalis acuta ređe su praćeni poremećajem opštег zdravstvenog stanja, sekrecija mleka je smanjena, mleko može da sadrži primese gnoja, sise su bolne i životinja se opire muži, epitel sluzokože cisterne je zadebljao, pored deskvamacije pojedinih ćelija mogu se uočiti velika izdignuća epitela usled izraženih subepitelijalnih edema. Perialveolarni intersticijum pokazuje prisustvo upalnog edema i slabe do srednje infiltracije neutrofilnih granulocita, limfocita i makrofaga. Makroskopski, četvrtine vimena su donekle otečene i može biti prisutan i subkutani edem. Dosta tvrdo tkivo vimena se, nasuprot mekom i elastičnom tkuviu vimena u laktaciji, može lako seći. Površina reza je vlažna i u zavisnosti od količine krvi sivo-smeđa ili sivo-crvena i usled povećanog unutrašnjeg pritiska resice, lagano je granuliran. mlečni kanali i cisterna, u zavisnosti od količine tečnog ili ćelijskog sluzav eksudata, sadrže masu koja ima serozni (**mastitis catarrhalis serosa**) odnosno sluzav karakter (**mastitis catarrhalis purulenta**). unutrašnji rub velikih mlečnih kanala i cisterne ima boju od sivo-žute do roze. Najčešći uzročnici ovog mastitisa su *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, mikoplazme, hlamidiye, virusi, kvasci.

Javlja se neposredno posle teljenja u periodu najveće mlečnosti. Mleko je obično promenjeno u prvim i poslednjim mlazevima, jer su streptokoke stanovnici izvodnih kanala u kojima je i glavno mesto njihovog patološkog delovanja.. Akutne mastitise u mnogo blažoj formi izaziva *Streptococcus dysgalactiae*, ali se veoma lako prenose sisanjem teleta iz jedne u drugu četvrt, zbog čega se naziva “sisajući mastitis”. na farmamam može biti prisutan od 7 do 75% ukupnih mastitisa. Prisustvo ove bakterije nađeno je u ranama na sisama 61 do 81%, a može preživeti niske i visoke temperature na raznim štalskim alatkama, mašinama i po nekoliko nedelja. Kao rezervoar streptokoka može biti koža krave, jer mikroorganizmi može da preživi od 1 do 26 dana.

Hronični kataralni mastitis – Mastitis catarrhalis chronica et interstitialis fibrosa može od samog početka imati slabo vidljivu klinički neupadljivu sliku. Eksudativni procesi se javljaju u pozadini, ali su regionalno različitog intenziteta i predstavljaju aktuelno suprotstavljanje organizma uzročniku. Makroskopski sekrecija uglavnom nije promenjena ali mleko sadrži povećan broj **somatskih ćelija** i ima specifičan ukus soli. Smanjuje se sekrecija mleka, a može i sasvim da prestane. Izrazita proširenja interalveolarnog tkiva nastaju usled prisustva limfocita, makrofaga, fibroblasta, fibrocita i kolagenih vlakana, imaju za posledicu

da se alveole međusobno pritiskaju. Periferni delovi žlezda se zbog toga smanjuju, delimično se formiraju u vidu cevi i u narednom periodu se redukuju. Alveolarni epitel sastoji se od kockastih do cilindričnih ćelija siromašnih citoplazmom. Takođe se značajno uvećava i intralobularno tkivo usled proliferaciju fibroblasta i formiranja vlakna, što ima za posledicu kompresivno dejstvo na cisternu žlezde i interlobularno postavljene mlekovode. Epitel suženih mlečnih kanala reaguje hiperplastično u vidu papiloformnih izbočina, što izaziva dodatno sužavanje unutrašnjeg prostora. Ostali mlečni kanali, kao i cisterna žlezde i sise, pokazuju prisustvo subepitelijskih, limfohistiocitarnih i vlaknastih upalnih žarišta, koja se izdižu iz lumena u vidu koplja ili kalema i mogu da ga delimično ili potpuno oštete. Makroskopski nalaz je različit, u zavisnosti od stepena i istezanja fibroznih i atrofičnih procesa. Četvrt može biti nepromjenjena u pogledu veličine, smanjena ili povećana. Izmenjena oblasti su grube na dodir, teško se sekut. Nеретко se događa da se parenhim vimena, naročito u oblastima blizu cisterni, potpuno preobratiti u grubo, sivo-beličasto vlaknasto tkivo bez prisustva alveolarne strukture. Na unutrašnjosti cisterne, sise i žlezde kao i velikih mlečnih kanala, kao posledica opisanih proliferacija epitelijuma i subepitelijalnih upalnih žarišta, mogu se uočiti čvoraste, bradavičaste i štapićaste izrasline. Kod keratinizirajuće metaplazije epitel izgleda kao da je presvučen beličastim naslagama. Sluzavo-supurativan sadržaj ukazuje na još uvek prilično masivne eksudativne upalne procese. Limfni čvorovi vimena su blago otečeni. Hronični kataralni mastitis i galaktoforitis predstavlja tipičan oblik infekcije sa *Streptococcus agalactiae* (galt-mastitis – mastitis “žutog mleka”, zarazno presušenje vimena).

Mastitis necroticans-haemorrhagica kod ovih upala na prvom mestu su regresivni procesi koji se brzo šire, kao i poremećaji cirkulacije i permeabilitete. Neke alveole imaju zatvorenu unutrašnju površinu usled degenerisanih ili nekrotičnih epitelialnih ćelija, druge su u velikoj meri bez epitela. U lumenu žlezde nalaze se ostaci unutrašnjih epitelialnih ćelija, eksudat bogat proteinima i fibrinom i uništeni leukociti. Ovi poslednji mogu da izostanu kod udarne koagulativne nekroze. Interalveolarni upalni edemi, visokostepena hiperemija ili perialveolarna kapilarna i dijapedezična krvarenja dovode do razmekšavanja parenhima mlečne žlezde. Krvni sudovi intraalveolarnog i interlobularnog tkiva pokazuju osim toga fibrinoidne zidne nekroze i parcijalna ili totalna začepljenja usled fibrinskih trombova. U interlobularnoj šupljini ustanovljeno je stvaranje edema, taloženje fibrina i tromboza limfnih sudova. Prošireni mlečni kanali sadrže konglomerate i fibrinske sastojke. Epitel mlešnog kanala je pretežno nekrotičan i oljušten, u ne-nekrotičnim regijama i metaplastičnim. Nekroza tkiva vimena prostire se preko alveola na veće, nepravilne oblasti, u kojoj se pojavljuje u početku uzak, a kasnije sve širi pojas pretežno raspadnutih leukocita. Ako životinje prežive akutnu fazu, iz ove periferne zone reakcije dolazi do širenja ili sekvencije ili fibroznih organizacija nekrotičnih žarišta. Kod leukocitarnog stapanja stvaraju se apscesi. Kod makroskopskog posmatranja izdvaja se upalni edem visokog stepena, koji ne zahvata samo potkožni sloj nego su otokom zahvaćene četvrti vimena i okolna površina. Plavocrvena boja kože vimena i nedostatak epitela su znaci kutanih nekroza. Grubo i napeto tkivo. Grubo i napeto tkivo vimena može se lako seći. Delimično vlažna, delimično usled fibrinske saturacije isušena površina reza je prošarana, pri čemu se nepravilno smanjuje žutosmeđe, žutocrvene i

tamnocrvene oblasti različite veličine. Vidljivi krvni sudovi sadrže trombove. Pojedini delovi izgledaju kao žutosmeđa- smeđecrvene, hemogene ili ispucale izumrle skupine sa perifernom razmekšanjima. Mlečni kanali i cisterna imaju veoma crvenu neretko fibrinom pokrivenu unutrašnju površinu. One sadrže krvavo-sluzavu tečnost neprijatnog mirisa, često sa fibrinom. Sadržaj je žućkasto-suv i sličan trombu. Otekline limfnih čvorova vimena su srednjeg ili visokog stepena. Nekrotizirajuće mastitise izazivaju *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella spp.*, *Pasteurella multocida*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Actinomyces pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*.

Piogeni mastitis - Mastitis apostematoso mastitits koji stvara apsesu uvek predstavlja proces koji prerasta u hroničan. Njemu prethode akutne faze izazvane pre svega *Actinomyces pyogenes*, ali i drugi uzročnici, kao što su *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Nocardia asteroides*. Kao polazna tačka smatra se opisana nekrozna žarišta, koja se razmekšavaju usled delovanja toksina i leukocitnih enzima. Na periferiji ovih razmekšanih žarišta stvara se gusti zid neutrofilnih leukocita, koji je sa svoje strane obavljen sa višeslojnim nakupinama makrofaga. U ovoj oblasti dešava se intezivna suprotstavljanja upalnih ćelija i uzročnika. Kao očigledan znak fagocitoze mogu se u citoplazmi makrofaga videti brojne bakterije. Mnoge upalne ćelije se raspadaju usled dejstva toksina i starosti same ćelije i mešaju se sa amorfnim apsesnim materijalom. Nakon toga se rani apses okružuje glanulacionim tkivom, u čijem unutrašnjem sloju preovlađuje radikalno postavljeni kapilari delimično okruženi limfocitima i ćelijama plazme. Sudovi ispunjavaju resorptivne funkcije i konstantno privlače nove upalne ćelije. Periferni deo upalnog tkiva koji zatvara apses sastoji se, pored krvnih sudova i skupina okruglih ćelija, prevashodno od cirkularno raspoređenih fibroblasta, fibrocita i kolagenih vlakana. Fibrozno upalna tkiva se prostire daleko u okolinu apsesa. Kod mastitis apostematoso javljaju se i supurativni fokusi, koji imaju drugačiju morfogenezu. Oni imaju polaznu tačku u purulentnim upaljenim mlekovodima. U slučaju žačepljenja distalnog sistema mlečnih kanala u proksimalnim sektorima dolazi do kavernastih proširenja usled gomilanja gnojne mase koja sadrži bakterije. Epitel mlečnih kanala se pri tome u velikoj meri oštećuje i zamenjuje upalnim tkivom, koje po svom sastavu liče na apsesnu membranu. Što se tiče obliterirajućih promena mlečnih kanala, one se razvijaju iz nekrotičnih upalnih procesa svojih zidova. Pri tome se lumen većih mlečnih kanala i cisterne delimično sužava, a neretko i potpuno zatvara usled rasprostranjenih oteklina od eksudata sa fibrinskim sadržajem ili usled stvaranja ćelijskog odnosno granulacionog tkiva. Fibrozna organizacija koja nastupa u daljem toku procesa dovodi do konačnog konsolidovanja obliteracije. Regioni žlezda koji nisu direktno zahvaćeni apsesnim procesom pokazuju prevashodno atrofične pojave i mogu imati kataralne kao i intersticijalne limfohistocistarne i fibrozne upalne promene. Kod aspekcije se može utvrditi da je obolela četvrt smanjena i da ima klupčaste konture. Neretko se vime prazni kroz stvorene fistulne kanale, a javljaju se i veće perforacije. Potkožno tkivo i vime je grubo i rapavo i usled toga se teško seče. Na površini preseka dominiraju višestruki apsesi veličine sočiva pa do veličine pesnice, napunjeni tečnim žućkastozelenim gnojem. Površina apsesne šupljine je žutosiva ili crvenosmeđa i skoro somotasta. Na nju je prikačena kožasta porcelan-bela apsesna kapsula.

Četvrti vimena sa izraženim apsesima skoro potpuno prikrivaju znake laktacije, koji se gotovo ne mogu prepoznati. Nezahvaćeno tkivo mlečne žlezde izgleda žutosmeđe, i imaju vlažnu površinu preseka. Mlečni kanali i cisterna sadrže tečnu ili gusto-kašastu gnojnu masu.

2.4. Faktori koji dovode do mastitisa

Mastitise uzrokuje mikrobioloski uzročnici. Oni pre svega obuhvataju bakterije, ali i gljivice (njihovi jednoćelijski predstavnici, kvasnice) i alge (prototeke) mogu da izazovu mastitis. Dokaze o virusima kao uzročnicima mastitisa je veoma teško naći.

Činjenica da se na osnovu bakterioloških nalaza ne može postaviti etiološka dijagnoza za svaki slučaj upale vimena (nezavisno od kliničke slike) ipak ne negira tvrdnju da mastitisi u principu imaju mikrobioloske uzročnike. Razlozi za dobijanje negativnog nalaza kod dokazivanja uzročnika mogu u pojedinim slučajevima biti sleseći:

- Ponašanje uzročnika
- Odbrambena sposobnost vimena, koja doprinosi redukciju izlučivanja uzročnika, čak i njihovom eliminisanju
- Metode za dokazivanje uzročnika

Mikroorganizmi koji izazivaju mastitise dele se u dve grupe. Prvu grupu čine mikroorganizmi kod kojih je samo obolelo vime mesto razmnožavanja, izlučivanja tj. izvor infekcije. Ovo ni u kom slučaju ne ograničava ulogu vektora za širenje i prenošenje bolesti (ljudi, oprema za mužu, stelja i oprema u štalama) pogotovo što je put infekcije ovih uzročnika isključivo preko sistema mlečnih kanala (galaktogeni put infekcije). Drugu grupu čine uzročnici mastitisa koji se naseljavaju izvan vimena, pri čemu mesta razmnožavanja i masovnog trajnog naseljavanja predstavljaju digestivni trakt, genitalije (tokom nesmetanog ali više tokom ometanog puerperiuma), i infektivni procesi kao što su apsesi, rana na koži i mišićima, papci. U prvu grupu spadaju *Streptococcus agalactica* i patogene mikoplazme, u drugu grupu ona obuhvata više grupe uzročnika, *Escherichia coli*, *Klebsielle*, *Pseudomonade*, *Staphylococcus aureus*, *Actinomyces pyogenes*, *Streptococcus uberis*, kvasci i protokoke. Dalja podela uzročnika je na *major pathogens* patogeni prvog reda (glavne patogene, uzročnike velike patogenosti) i *minor pathogens* patogeni drugog reda (sporedne patogene, uzročnike male patogenosti). Ovakve podjelu po grupama uzročnika na osnovu njihovih glavnih izvora i patogenosti važne su pre svega kod izbora mere za suzbijanje obolenja. Izgledi za eliminaciju određenog uzročnika iz zapata su mnogo veći ako se njegov izvor uspešno isključi. Od rezervoara uzročnika mastitisa (izvora infekcija) treba razlikovati vektore, preko kojih se infekcija širi od zapata do zapata, životinje do životinje, vimena do vimena ili od četvrti do četvrti. Konačno treba voditi računa o putevima infekcije na vimenu

kod kojih razlikujemo galaktogeni (preko sisnog kanala), hematogeni i limfogeni (lokalno, preko limfnih prostora tkiva vimena) put.

Opšti poremećaji kod mlečni krava i obolenja drugih organskih sistema koga npr. mlečne žlezde se u principu odvijaju u dva pravca: širenje uzročnika preko inficiranih jedinki u zapatu i poremećajima odbrambenih mehanizama. Kao primeri za to navode se sledeća obolenja:

- Infekcije papaka i ekstremiteta ili genitalnog aparata izazvane uzročnicima gnojenja, naročito *Actinomyces pyogenes*. Ove infekcije mogu biti povezane sa učestalim pojavama pyogenes- mastitisa u zapatu, pri čemu kod pojedinačnih životinja može da postoji ova povezanost.
- Obolenja praćena groznicom i drugim opštim poremaćajima, pre svega upalni procesi papaka i udova, obolenja izazvana stranim telima i pneumonije, koje izazivaju smanjenje proizvodnje mleka, porast sadržaja ćelija i druge promene sastava mleka i na koja se mora obratiti posebna pažnja u smislu diferencijalne dijagnostike subkliničkih mastitisa.
- Akutne infektivne bolesti, koje često predstavljaju epidemije, kao npr. slinavka i šap, goveda kuga, kataralna groznica, papilomatoza i kravljie beginje, mogu (posredstvom obolenja kože vimena izazvanim sekundarnim uzročnicima – afte, dermatitis, beginje) da pređu u akutne mastitise. Isto važi i za rane na koži vimena kod stephanofilarioza, fotosenzitivnosti, erozije, opeketina i uboda insekata.
- Poremećaji razmene materija i poremećaji izazvani ishranom često mogu biti praćeni upalama vimena. Razlozi za to su delovanje toksina i produkata razmene materija na tkivo vimena, smanjenje lokalne odbrambene sposobnosti ili direktno delovanje produkata lučenja mlečne žlezde na bakterijsku floru vimena.

2.5. Profilaksa i terapija mastitisa

2.5.1. Profilaksa mastitisa:

Profilaksa mastitisa kod krava podrazumeva niz aktivnosti koje treba preduzeti da ne dođe do pojave mastitisa. Obavezna je svakodnevna kontrola vimena, kao i ispunjenje osnovnih zoohigijenskih i zootehničkih uslova. Pranje vimena pre svake muže, pravilna ručna i mašinska muža, kao i potapanje sisa u dezinficijens, predstavljaju nezaobilazne činioce u suzbijanju mastitisa. Ručna muža sa povijenim palcem kod meko muznih krava dovodi do oštećenja sfinktera sisnog kanala, te omogućava nesmetan prođor mikroorganizma u vime

(Pavlović, 2001). Mašinska muža aparatima sa poremećenim pulzatorom i lošim vakumom, kao i istrošenost sisnih čaura, otvara mogućnost infekcije mlečne žlezde i nastanak mastitisa. Nepravilno korišćenje aparata za mužu je glavni faktor pojave subkliničkih mastitisa (Katić, 1990). Za sprečavanje širenja infekcije vimena u zapatima muznih krava, kao i za sprečavanje kolonizacije sisnog kanala, obavlja se dezinfekcija vimena pre muže, dezinfekcija sisnih čaša između dve muže i dezinfekcija papila posle muže. Dezinfekcijom papila krava posle muže smanjuje se broj infekcija vimena u stadu (Katić, 1990). Za dezinfekciju papila posle muže koriste se dezinficijensi koji u sebi sadrže i repelente protiv ujeda insekata, a da pri tome ne oštećuju kožu papila, potpomažu saniranje lezija, uništavaju mikroorganizme i odbijaju insekte, a ne utiču na zdravstvenu ispravnost mleka. Danas su u upotrebi preparati koji ispunjavaju ove zahteve i pripadaju grupi jodoformnih, hipohloridnih i hlorheksidnih preparata. Dezinfekcija aparata za mužu i sisnih čaura ili čaša obavlja se tako što se sisne čaure potope u dezinficijens. Moguće je sisne čaure potopiti i u toplu vodu u trajanju od 5 sekundi smanjuje kontaminaciju sisnih čaura bakterijama i pogodna je za izmuzišta tipa riblje kosti. Terapija mlečne žlezde u zasušenju podrazumeva lokalnu aplikaciju antibiotika nakon poslednje muže. Ovaj postupak se može smatrati i preventivnim, s obzirom da u narednoj laktaciji treba da se obezbedi što duži period neinficiranosti vimena. Terapiju u zasušenju treba sprovoditi antibioticima širokog spektra ili ciljanim preparatima prema urađenom antibiogramu (Pavlović, 2001). S obzirom da se u subkliničkom toku bolesti obavezno u laktaciji leče infekcije vimena izazvane bakterijama *Streptococcus agalactiae* i *Staphylococcus aureus*, dok se ostali uzročnici samo identifikuju, potrebno je da se uradi antibiogram i za ostale uzročnike, kako bi se u zasušenom periodu lečili odgovarajućim antibiotikom (Gruneth, 1996). Preparati koji se koriste u zasušenom periodu su posebno obeleženi za korišćenje u tom periodu, a pokrivaju kompletну antibiotsku paletu lekova. Pravilno izvedena terapija u zasušenju sprečava nastajanje novih infekcija u zasušenom periodu i smanjuje broj starih infekcija vimena (Pavlović, 1996). Treba napomenuti da se u ovom periodu izleći oko 80% krava obolelih od mastitisa izazvanog *Staphylococcus aureus*-om, u odnosu na oko 40% izlečenja u laktaciji. Čak do 90% streptokoknih mastitisa se izleći u ovom periodu, u odnosu na 70% izlečenja u laktaciji (Boboš, 2001).

2.5.2. Terapija mastitisa:

Terapija akutnog i hroničnog kataralnog mastitisa sprovodi se lokalno (intracisternalno) i parenteralno. Lokalna terapija se sastoji u tome da obolele krave treba odvojiti i izmuzati nakon zdravih životinja. Najčešći prouzrokovači ovog mastitisa su bakterije iz roda *Streptococcus* (*Str. agalactiae*, *Str. dysgalactiae*, *Str. uberis*). Kod kliničke forme mastitisa potrebno je aplikovati visoku dozu penicilina G (2-4 miliona i.j./po četvrti/po aplikaciji), ili polusintetskog penicilina (Pavlović, 2001; Gruneth, 1996). Kod streptokoknih mastitisa ređe se koriste drugi antibiotici iz razloga što su streptokoke osetljive na penicilinske preparate, koji su lek izbora za ove mastitise. Ako dijagnoza nije sigurna ili potvrđena, treba koristiti

lokalnu intracisternalnu aplikaciju antibiotika širokog spektra (500 mg ampicilina, 200-300 mg cefalosporina ili 500 mg tetraciklina, pri čemu treba biti oprezan jer iritiraju vime) (Gruneth, 1996). Moguće je koristiti i razne kombinacije antibiotika u cilju proširenja spektra, kao na primer gentamicin + penicilin (300 mg + 1-3 miliona i.j.) i sl. Pre tretmana životinji treba dati oksitocin 20 i.j. intravenozno, dobro je izmusti, a obolelu četvrt treba dobro isprati fiziološkim rastvorom (Tyler, 1992). Terapiju ponavljati na svakih 12-24 sata. Kod parenteralne terapije mora se imati u vidu da je zbog infekcije vimena narušena barijera krv-mleko i stoga nije omogućen prolazak antibiotika kroz lipidnu membranu u obimu kao što je kod očuvanog vimena. U tim slučajevima je indikovano davanje pentamat-hidrohlorpenicilina (5-10 miliona/i.j. i makrolidnih antibiotika 3-5 g eritromicina, tilozina) (Gruneth, 1996). Radovi Brown-a (1990) pokazuju da je *Str. agalactiae* osetljiv u 95% slučajeva na linkomicin i spektinomicin. Ako se sumnja da su izazivači iz roda *Staphylococcus*, u praksi su se dobro pokazali antibiotici koji nisu osetljivi na enzim penicilinazu (oksicilin 400-1000 mg/po četvrti), koju sintetišu ove bakterije. Kod stafilokoknog mastitisa mogu se koristiti i cefalosporini, makrolidi, u gore navedenim dozama, kao i tetraciklini (400 mg) (Pyorala, 2002). Terapija piogenog mastitisa može se sprovesti lokalno i parenteralno. Najčešći uzročnici ovog mastitisa su *Arcanobacter pyogenes*, ređe *Staphylococcus aureus*, a retko *Spherophorus necrophorus* i ostali. Promena u vimenu koju izazivaju ovi mikroorganizmi je apostematoznog tipa, odnosno stvaraju se apscesi u parenhimu mlečne žlezde. Lečenje je moguće samo kod pojedinačnih, dobro inkapsuliranih apscesa, koji su blizu površine, nakon njihovog pucanja i otvaranja. Kod velikog broja apscesa, gde je otok tkiva obimniji, predlaže se ekonomsko iskorišćavanje životinje. Lečenje apscesa ili amputacija obolele četvrti može se sprovesti kod visoko vrednih grla, kao što su bikovske majke ili visoko mlečne rekorderke. Kod febrilnih stanja indikovano je davanje antibiotika širokog spektra (cefalosporini 3-5 g, sulfonamidi 50 g intravenski i sl.), a parenteralna terapija traje dok je životinja febrilna. Obbolelu četvrt treba tokom dana što češće izmuzati i uveče ubaciti antibiotik. Terapija ne sprečava pojavu bolesti i njeno širenje, pa je profilaksa jedini pravi način borbe protiv ovog mastitisa. Profilaksa se sastoji u upotrebi insekticida, bilo u vidu zaprašivanja životinje ili upotrebom ušnih markica koje su natopljene repelentima protiv insekata (Grunerth, 1996, Hillerton, 1988). Terapija flegmonoznog mastitisa sastoji se od lokalne i parenteralne terapije. Najčešći uzročnik flegmonoznog mastitisa jeste *E. coli* i drugi koliformni mikroorganizmi. Preporučuje se parenteralna uporeba antibiotika širokog spektra, i to gentamicina, tetraciklina i sl. Kod perakutnih stanja indikovano je intravensko davanje antibiotika, oksitocina u dozi od 30 i.j. intravenski, kao i velike količine dnevne kontinuirane intravenske infuzije (do 100 ml/kg t.m.). Primjenjuje se i davanje diuretika u cilju eliminacije toksina iz krvi (Anderson, 1989; Smith, 1985). Terapija granulomatoznog mastitisa se sprovodi uglavnom samo lokalno. Na osnovu veterinarskih propisa, do sada korišćeni antimikotici (Nystatin, Clotrimazol) se ne mogu više koristiti kod goveda. Lečenje se sprovodi upotrebom Natamicina, i to u količini od 1 g (100 mg aktivne supstance), koja se rastvori u 500 ml fiziološkog rastvora i aplikuje u cisternu vimena (Stanojević, 2001). Obavezno je temeljno izmuzanje i ispiranje obolele četvrti.

2.5.3. *Arcanobacterium pyogenes*

Arcanobacterium pyogenes je stolom i oportunistički patogen ekonomski važan za stoku, izazivajući bolesti kao mastitis, absces jetre i upale pluća. Ovaj organizam poseduje niz faktora virulentnosti koji doprinose patogeni potencijal. *Arcanobacterium pyogenes* izražava holesterola-zavisni citolizin, piolizin, koji je aemolizin i koji je citolitik za imune ćelije, uključujući i makrofaga. Ekspresija piolizin je potreban za virulentnost i to je molekul koji je najperspektivniji kandidat vakcina, do sada identifikovan. *Arcanobacterium. pyogenes* poseduje niz mehanizama prijanjanja, uključujući dva neuraminidazu, čija je akcija neophodna za potpuno prijanjanje na epitelne ćelije, i nekoliko ekstracelularnih matriks proteina koji se vezuju, uključujući proteine kolagena za vezivanje, koji mogu biti potrebni za lepljenje na kolagen-bogata tkiva. *Arcanobacterium piogenes* takođe izražava fimbrije, koje su slične tipu 2 fimbrije od *Actinomices naeslundii*, i formira biofilmove. Međutim, uloga ovih faktora u patogenezi *Arcanobacterium pyogenes* infekcija ostaje da se razjasni. *Arcanobacterium pyogenes* takođe okupira i opstaje u epitelnim ćelijama i može da opstane u J774A.1 makrofaga do 72 časa, što ukazuje na značajnu ulogu *Arcanobacterium pyogenes* interakciju sa ćelijama domaćinima tokom patogeneze. Dvokomponentni regulatorni sistem, PloSR, gore-reguliše piolizin izražavanja i biofilma ali dole-reguliše ekspresiju proteaza, sugerujući da to može delovati kao globalni regulator *Arcanobacterium pyogenes* virulentnosti. U *pyogenes* je svestran patogen, sa arsenalom virulentnosti determinanti. Međutim, većina aspekata patogeneze infekcije izazvane ovim važnim oportunističkim patogenom ostaju slabo okarakterisani.

2.5.4. *Clostridium perfringens*

Clostridium su anaerobne, sporogene, gram-pozitivne bakterije, koji su široko rasprostranjeni u prašini, tlu, na biljkama i u digestivnom traktu ljudi i životinja. Iako je otkriveno gotovo 100 vrsta iz roda *Clostridium*, samo 25 do 30 uobičajeno uzrokuju bolest kod ljudi ili životinja.

Najčešće manifestacije kolonizacije klostridijima kod životinja su blaga, kratkotrajna trovanja hranom i slučajna kontaminacija rane. *Clostridium perfringens* prouzrokuju mastitise koji se javljaju kod goveda i koza sporadično, dok se kod ovaca javljaju u vidu epidemije i imaju veliki ekonomski značaj.

Toksini koje produkuju klostridije pripadaju egzotoksinima. Klimatski faktori, ishrana, stres i poremećaji potencijala vodonika usled dejstva drugih bakterija su predisponirajući faktori za izazivanje oboljenja. Clostridije prodiru u organizam galaktogenim putem, ali i preko kontaminiranih instrumenata i posuda za medikamente. Pri razmnožavanju klostridija dolazi do stvaranja velike količine gasa i to pretežno H₂S. Patogeno dejstvo potiče od stvaranja gasova, koji se oslobođaju prilikom sporulacije i raspadanja ćelije. Radi se o

termolabilnom proteinu sa nekrotičnim i hemolitičkim svojstvima. Stvara se snažan upalni edem sa krvarenjima i nekrotizacijom parenhima vimena. Toksini koje stvaraju klostridije,pored promena vimena, hematogenim putem mogu da izazovu teške poremećaje opštег stanja. Ozbiljne klostridijalne infekcije nastaju u sinergizmu sa stafilocokus aureusom, dok same prouzrokuju oboljenje sa tendencijom ka izlečenju.Za samo nekoliko sati dolazi do flegmonozne upale u oblasti osnove sise, dok se u središtu ovog oboljenjalazi gasni edem na jednoj ili više četvrti. Vime je uvećano, toplo, intenzivno crveno i prilikom palpacije pucketa. Iz vimena se uočava sekret koji je žućkasto-smeđ, krvavo gnojav, sa komadićima tkiva, mehurićima i veoma neprijatnog mirisa. Nekrotizacija tkiva zahvata celo telo i dovodi do uginuća za 12 do 24 časa. Dokazivanje se vrši inokulacijom uzročnika u jetrin bujon., gde nakon par sati dolazi do razmnožavanja mikroorganizama, praćeno intenzivnim zamućenjem i stvaranjem gasa. Mastitisi koji su izazvani klostridijama u odnosu na mastitise izazvane drugim patogenima.

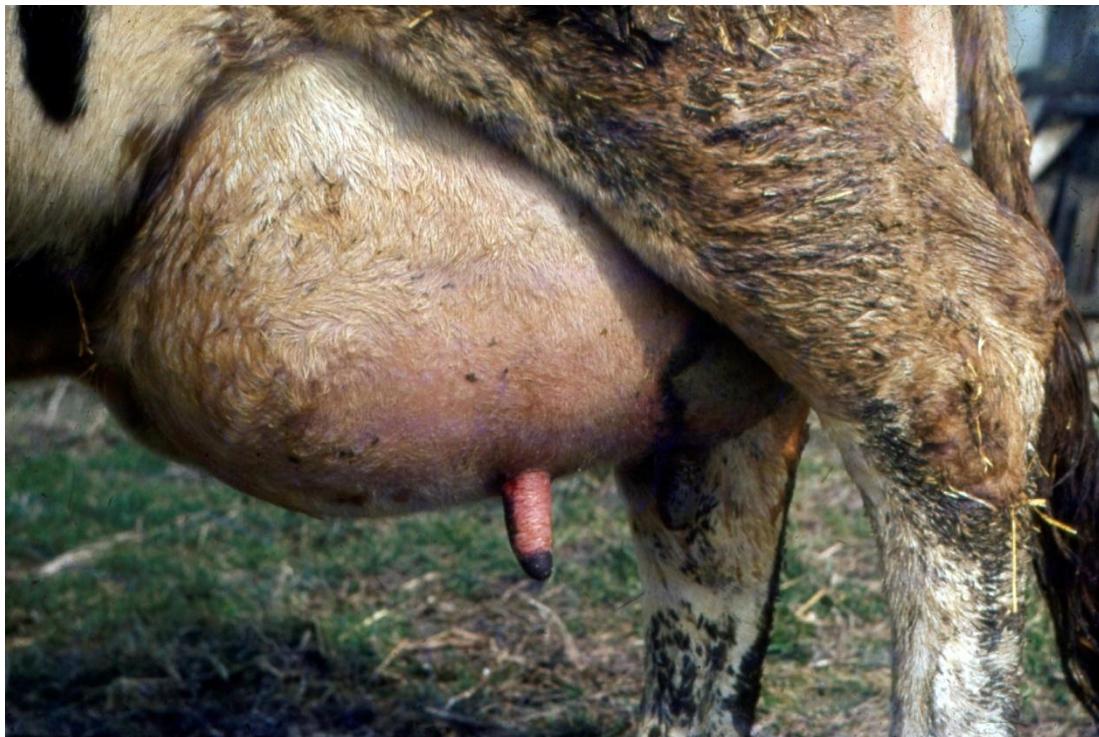
2.5.5. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus je Gram pozitivna nepokretna bakterija,čija je veličina 0,8 do 1 mikrometar,okruglog oblika, pod mikroskopom se uočavaju u vidu grupica koje podsećaju na grozdove, koagulaza pozitivne. *Staphylococcus aureus* predstavlja potencijalnog uzročnika mastitisa, gde je prema mnogo istraživanja odgovoran za infekcije 90% stada. Oštećeće parenhim vimena i uzrokuje gubitke u proizvodnji mleka. U nekim stadima su junice inficirane već pre prvog teljenja. Bakterije žive u drugim delovima tela npr. rektumu,ustima, reproduktivnom traktu, koži sisavimenu. Bakterije se prenose rokama muzača, krpama za pranje vimena, nečistim muznim aparatima i zaostalim mlekom u čašama za mužu. Bakterije su prijemčive za sluz vimena i kada prodru u vime vezuju se za mast, te na taj način prodiru dublje u tkivo vimena. Žive u fagocitu u koji dospevaju fagocitozom, te su i na taj način zaštićene. Fagocite Staph. aureus koristi za razmnožavanje u njima i ujedno da pomoći njih odlazi dublje u parenhim. Ima veoma dug period inkubacije, te zbog toga stado koje je inficirano, me dugo biti bez kliničkih znakova obolenja. Dobro se razmnožavaju na čvrstim hranljivim podlogama gde obrazuju okrugle kolonije. Kolonije su pigmentirane u zlatno-žuti pigment,ali neki sojevi mogu imati i beli pigment. Kolonije su veličine 3 do 5 milimetara. *Staphylococcus aureus* stvara:

- alfa
- beta
- delta hemolizin.

Alfa i beta hemolizin luče patogeni sojevi stafilokoka. Ovaj toksin ima hemolitičko, citotoksično,dermanekrotično i letalno dejstvo. Oštećeće nervni sistem,glatku muskulaturu, izaziva nekrozu kože, inhibira migraciju neutrofila i monocita. Beta hemolizin razlaže svingomijelin u ćelijskoj membrani, a najosetljiviji su eritrociti goveda,ovaca i koza. Beta

toksin ne lizira ćelije, ali pomaže dejstvo drugih litičkih agenasa. Antigene osobine stafilocoka uslovljene su građom ćelijskog omotača koji usebi sadrži složeni peptidoglukan kao deo spoljašnjeg zida i kompleks mukopolisaharida, koji ulazi u sastav jedinice unutrašnjeg zida. Velika smetnja u stvaranju vakcine protiv *S. aureus*-a je ekstracelularni polisaharid koji mikroorganizmi formiraju kada uđu u mlečnu žlezdu.



Stafilocokni gangrenozni mastitis koji je zahvatio četvrtinu vimena (Boboš S.)

Kapsula dopušta da komplement i antitela penetriraju, ali maskira prepoznavanje mikroorganizma od strane antitela polimorfonukleara, kao i sprečavanje aktivacije komplementa. Finally (1990) smatra da u mlečnoj žlezdi postoje tri tipa komponenti sa kojima mikroorganizmi reaguju, a to su sekretorni produkti ćelija, površina ćelije domaćina i ekstracelularni matriks.

Vezivanje bakterija za epitelne ćelije mlečne žlezde se dešava pomoću dva površinska proteina. Jedan se vezuje za glikoprotein fibronektin koji je prisutan na površini ovih ćelija, dok je drugi hemaglutinin koji pomaže vezivanje ze epitelne ćelije mlečne žlezde i kolagen. *S. aureus* se vezuje za proteine membrane masnih kapljica kravlje mleke i epitelne ćelije mlečne žlezde pomoću proteina ćelijskog zida, što mu omogućava održavanje i širenje u mlečnoj žlezdi. Vrlo je *Staph. aureus* teško iskoreniti iz stada, ali mere kontrole koje se sastoje od dezinfekcije sisa pre i posle muže, uzimanjem uzoraka mleka, upotrebom antibiotika u vreme zasušenja i kontrolom krava koje ulaze u stada može smanjiti stopu infekcije na zadovoljavajući nivo.

3.0. Cilj i zadaci istraživanja

Cilj istraživanja:

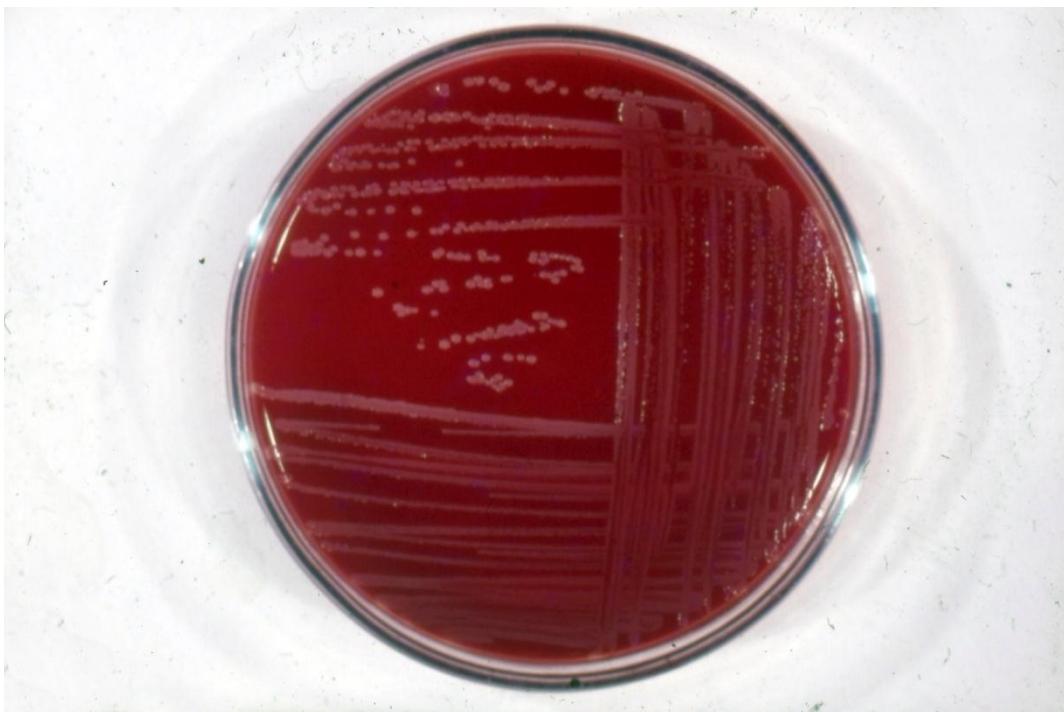
Gangrenozni mastitisi predstavljaju zdravstveni i ekonomski problem u stočarskoj proizvodnji. U cilju zaštite krava od gangrenognog mastitisa, da bi se izbegao veliki broj obolelih životinja, pristupa se merama imunizacije sa komercijalnim i štalskim (autohtonim) vakcinama.

Zadaci istraživanja:

- U populaciji krava holštajfrizijske rase evidentiraće se pojave gangrenognog mastitisa, klinička stanja obolelih krava kao i efekat primenjene terapije.
- Utvrdiće se etiologija gangrenognog mastitisa i pristupiće se merama imunoprofilakse.
- Kod krava i junica u 7. mesecu graviditeta uzeće se uzorci mleka i sekreta iz vimena radi identifikacije eventualno prisutnih patogena. Sojevi *Staphylococcus aureus* biće sačuvani za proizvodnje autohtone vakcine na ispitivanim farmama.
- Pratiće se efekat primenjene vakcine na ispitivanim kravama i junicama.

4.0. Materijal i metode

Smatrajući da obolenje vimena kod preživara predstavlja polimikrobnu infekciju dospevanjem različitih patogenih mikroorganizama iz okoline. Sa farmi krava u severno-bačkom i južno-bačkom okrugu prikupljaće se podaci kliničkog pregleda vimena koji se sastoji od adspekcije i palpacije. Nakon čega će se aseptično uzimati uzorci mleka i sekreta vimena za bakteriološku obradu. Obrada uzoraka vršiće se u labaratorijama Naučnog instituta za veterinarstvo. Obrada uzoraka vršiće se na kolonije koje su izrasle na hranljivim podlogama (krvni agar). Identifikacija izolovanih bakterija vršiće se na osnovu njihovih morfoloških, kulturalnih i biohemičkih svojstava. *Staphylococcus aureus* raste na krvnom agaru u vidu okruglih belih, sivo-belih, a ponekad i žućkastih kolonija prečnika 3-5 mm sa $\alpha\beta$, a najčešće β hemolizinom. Patogenost izolata *Staphylococcus aureus* proverava se koagulaza mannit reakcijom. Dobijeni izolati čuvani su za proizvodnju štalske (autohtone) vakcine.



Kultura *Staphilococcus aureus*-a izolovana na podlozi (Boboš S.)

4.1. Ispitivanje prisustva antihemolizina titracijom

Određivanje hemolitične aktivnosti supernatantne tečnosti odvojena nakon centrifugiranja pune kulture *Staphylococcus aureus*, odnosno utvrđivana je jačina hemolizina izražena u HJ (hemolitičkim jedinicama).

Nakon toga je u postavljen niz od 10 epruveta dodavan ispitujući hemolizin, tako što je u prvu epruvetu dodat 1ml, a u ostale uvek za 0,1ml manje. Zatim je dodat fiziološki rastvor, u prvu epruvetu ništa, a u ostale uvek za 0,1ml više. na taj način smo u svakoj epruveti imali po 1ml. Na to je dodato u svaku epruvetu po 0,1ml 5%-ne suspenzije eritrocita. Tako pripremljena mešavina je inkubirana 12 do 16 sati u termostatu na 37 stepeni celzijusa. Za kontrolu je služila mešavina 1ml fiziološkog rastvora i 0,1ml eritrocita.

Antihemolitička aktivnost ispitujućeg seruma vršena je tako što je u niz od tri epruvete dodato 0,5ml, 0,25ml i 0,1ml ispitujućeg seruma, zatim istim redom 0,5ml, 0,75ml i 0,9ml hemolizina poznate vrednosti i na kraju 0,1ml 5%-ne suspenzije eritrocita u svaku epruvetu. Za kontrolu su služile dve mešavine, prva je sadržavala 1ml hemolizina i 0,1ml eritrocita, a druga 1ml fiziološkog rastvora i 0,1ml eritrocita. Inkubacija je trajala 12 do 16 sati na 37 stepeni celzijusa u termostatu. pozitivan rezultat je značio odsustvo hemolize u radnim razređenjima, pod uslovom da je u prvoj kontroli bilo hemolize, a u drugoj ne.

Kulture *Clostridium perfringens* izolata pripremljeni su iz kuvanog mesa i čuvani su na temperaturi od -20 stepeni. Pre upotrebe u eksperimentima, bakterije se prvo kultivisu na 37 ° C, u fluidnom tiogliceolat mediumu. Da bi se obezbedila čistoća kulture, uzorci koji su inkubirani su zasejani na agar pločama koje sadrže 0,1% cikloserin i inkubirane preko noći na 37 ° C pod anaerobnim uslovima. Bakterije su nakon toga gajene sa 2% glukozom, 1% ekstrakt kvasca i 0,1% L-cistein-om, da bi se procenio vegetativni toksin.

4.2. Priprema i primena vakcina

U našem radu praćena je primena štalske (autohtonu) vakcine, koju smo dobili dodavanjem antiga Staphylococcus aureus-a u postojeću komercijalnu vakcinu koja je sadržala sojeve *Clostridium perfrigens* i *Arcanobacterium pyogenes*.

4.3. Pripremanje autohtone vakcine

Za pripremanje autohtone vakcine korišćen je soj sa dobim imunogenim svojstvima. Pre zasejavanja podloga je zagrevana na temperaturu 37-40 stepeni. Inkubiranje zasađenih podloga vršeno je u toku 24 sata na temperaturi od 37 stepeni. Nakon inkubiranja kulture su pregledane mikroskopski, bojene po Gram-u, na čistoću rasta i biološkim ogledom, vakcinisanjem po dva miša subkutano sa 0,5ml na patogenitet. Umrtljavanje kulture je vršeno dodavanjem 40% formalina u koncentraciji od 0,5% i držanjem na temperaturi od 37 stepeni celzijusa u toku 3 dana. Kontrola delovanja formalina vršena je vakcinisanjem miševa sa 0,5ml formalizovane kulture subkutano i posmatranjem istih u toku 3 dana. Za rad je upotrebljena kultura od koje su miševi preživeli. Obaranje kulture vršeno je adsorbcijom, dodavanjem 20%-nog aluminijum-hidroksid gela u koncentraciji od 15%.

5.0. Rezultati ispitivanja

5.1. Učestalost pojavljivanja gangrenoznog mastitisa

Na farmi krava gde je učestalost gangrenoznog mastitisa u šestogodišnjem periodu prouzrokovala oboljenje kod 73 krave. Bolest se pojavljivala neposredno posle partusa. Da bi se očuvalo zdravstveno stanje vimena, pristupilo se vakcinaciji koja se vršila polivalentnom štalskom (autohtonom) vakcinom koja je sadržala štalske oblike antiga. Vakcinacija je vršena subkutanom aplikacijom gravidnim junicama i kravama u sedmom mesecu graviditeta, nakon čega je primećena pojava blagog otoka na mestu aplikacije vakcine. Da bi sprečili pojavu otoka, koji je reakcija na nosač, količina od 5ml je bila podeljena u dva jednaka dela i tako aplikovana. Nakon davanja vakcine otok se pojavio na 4 krave i nestao za 10 dana. Životinje koje su bile vakcinisane nisu pokazivale promenu opšteg stanja, niti su imale povećanu temperaturu. Kod ne vakcinisanih krava gangrenozni mastitis se pojavljivao prosečno nakon 11.6 dana nakon partusa, dok se kod vakcinisanih krava štalskom vakcinom, pojavio tek 156 dana nakon partusa samo u jednom slučaju. Dobijeni rezultati kod prvotelki ukazuju na dobar efekat vakcinacije u preveniraju gangrenoznog mastitisa, jer je lečenje gangrenoznog mastitisa veoma teško i mali je procenat izlečivosti.

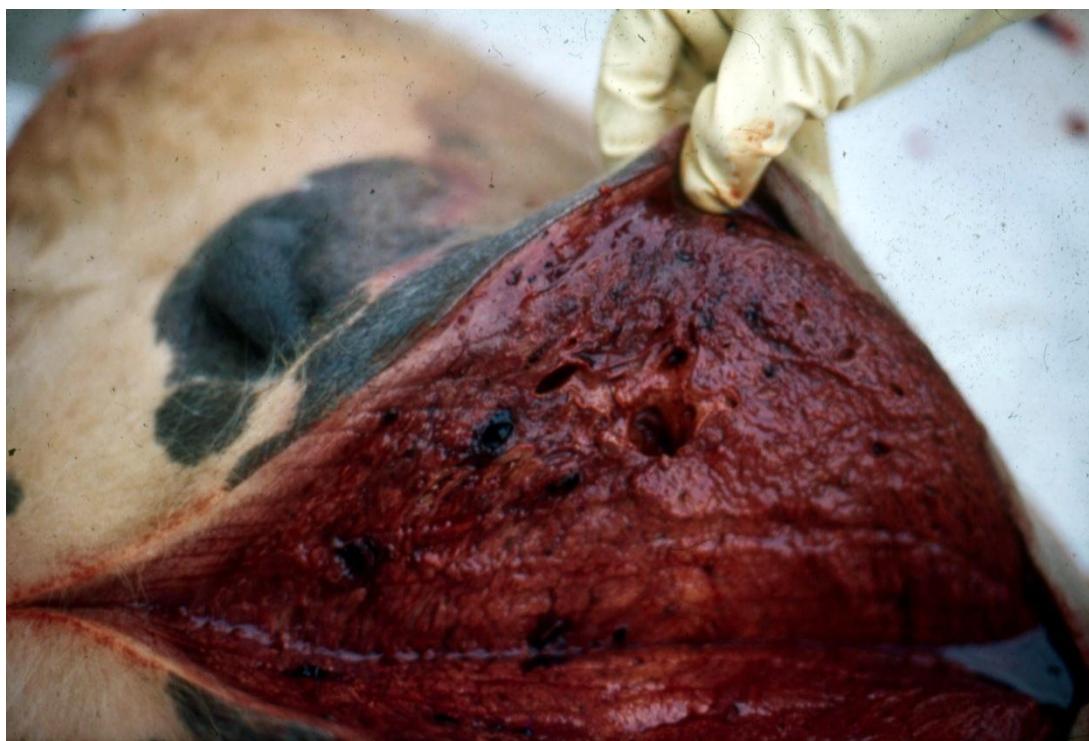
5.1.2. Primena štalske (autohtone) vakcine

Primena vakcine: u postojeće komercijalne vaccine koje su u sebi sadržale sojeve Clostridium perfringens i Arcanobacterium pyogenes dodat je i Staphylococcus aureus dobijen iz sekreta vimena krava sa gangrenoznim mastitisom sa pomenute farme.



Gangrenozni mastitis krave čiji je uzročnik *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus je uzročnik gangrenoznog mastitisa koji zahvata celo vime, ali primenom štalskih vakcina se veoma dobro suzbija, a kod krava kod kojih se pojavio nakon 156 dana od vakcinacije, pri njegovoј izolaciji je utvrđena promena u morfološkim, kulturnim, biohemijskim i antigenim svojstvima. Štalska vakcina sadrži antigen *Staphylococcus aureus*. Stafilokoke produkuju toksine koji su odgovorni za različite pojave bolesti. Alfatoksin, vazokonstrikcijom dovodi do ishemije, nekroza i zajedno sa beta toksinom dovodi do nekrotičnog mastitisa, koji se pre svega javlja kod mladih krava na početku laktacije. Alfatoksin može neposredno da uništi leukocite. Leukociti tj neutrofili mogu u sebi sadržati opsonizovane stafilokoke koje preuzimaju odbrambenu ulogu uzročnika. Hronični stafilokokni mastitis se može pretvoriti u akutnu gangrenoznu upalu. Novonastale slučajeve histološki karakteriše masovno naseljavanje stafilokoka u alveolama, koji su okruženi hijalinskim materijalom i maolobrojnim granulocitima. Na površini preseka zadnjih četvrti mogu se uočiti čvorovi, slaninasti po površini, sa milijarnim uraslinama. Histološki se uočavaju bakterije urasle u eozinofilni materijal, periferno okružene segmentiranim leukocitima, makrofagama i limfocitima. U slučaju nekrotičnog stafilokoknog mastitisa, izostaju promene nastale stvaranjem gasova kao kod klostridijalnih infekcija. Inficirano vime i koža predstavljaju glavni rezervoar uzročnika *Staphylococcus aureus-a*. Često se uzročnik može izolovati sa sisa zdravih krava.



Vime krave čija je struktura izmenjena usled dejstva Stafilokoknih hemolizina (Boboš S.)

Tabela 1. Pojava gangrenoznog mastitisa na farmama krava u šestogodišnjem periodu.

Godina	Broj krava		Broj tretiranih krava		Broj prinudno zaklanih		Broj uginulih		Broj izlečenih	
	Broj	%	Broj	%	Broj	%	Broj	%	Broj	%
1	11	15%	11	15%	8	11%	3	4%		
2	18	25%	18	25%	11	15%	7	9%		
3	9	12%	9	12%	5	6%	2	2%	2	2%
4	14	19%	5	6%	1	1%	5	6%		
5	13	18%	3	4%	11	15%	2	2%		
6	8	11%	2	3%	6	8%	2	2%		
ukupno 6	73	100%	48	65%	42	56%	21	25%	2	2%

Podaci su prikupljeni sa terena iz veterinarskih stanica, na osnovu kojih smo dobili dužinu trajanja zaštite životinja koje su vakcinisane i štalskom vakcinom. Štalska vakcina je sadržala bakteriološki izolat *Staphylococcus aureus*, dok su u vakcini sačuvani i standardni izolati. Vakcinacija 48 krave i junice je vršena u 7. mesecu graviditeta, a efekat vakcinacije je praćen tokom naredne laktacije.

Tabela 2. efekat primenjene vakcine kod vakcinisanih prvotelki u odnosu na krave koje nisu vakcinisane (u prethodnom periodu) na pojavu oboljenja nakon partusa.

	Broj krava	Broj krava kod kojih se pojavio gangrenozni mastitis	Broj dana od partusa i pojave gangrenognog mastitisa
Vakcinisane	48	1	156
Kontrola	73	73	11,6

5.2. U radu su opisani efekti vakcinacije prvotelki i drugotelki štalskom (autohtonom) vakcinom, gde je merenjem nivoa titra aglutininskih jedinica utvrđeno da titar raste do 90 dana (tabela 3), kao i titar antitoksina Cl. perfringensa (tabela 4).

Vakcinacija je sprovedena na 48 junica i titar aglutininskih jedinica je maren nultog, dvadeset prvog i devedesetog dana. Pošto je štalska vakcina dobijena dodavanjem *Staph. aureus*-a u komercijalnu vakcincu, merenje titra aglutininskih jedinica je vršen i 270-og dana, gde uočavamo pad nivoa titra, ali to nam dokazuje da je rezultat vakcinacije mnogo duže postojan. Podaci koji su prikazani u tabeli 5 ukazuju da je postojanje titra antihemolizina *Staph. aureus*-a bilo prisutno i 270 dana od revakcinacije i iznosilo 0,702.

Tabela 3. nalaz titra aglutininskih jedinica Arc. pyogenes-a u krvnom serumu vakcinisanih junica koji je meren nultog, dvadesetprvog i devedesetog dana od revakcinacije.

Br. vak. junica	Titar aglutininskih jedinica <i>Arcanobacterium pyogenes-a</i>		
	na 0 dana	21. dana	90. dana
48	0	53,33	98,75

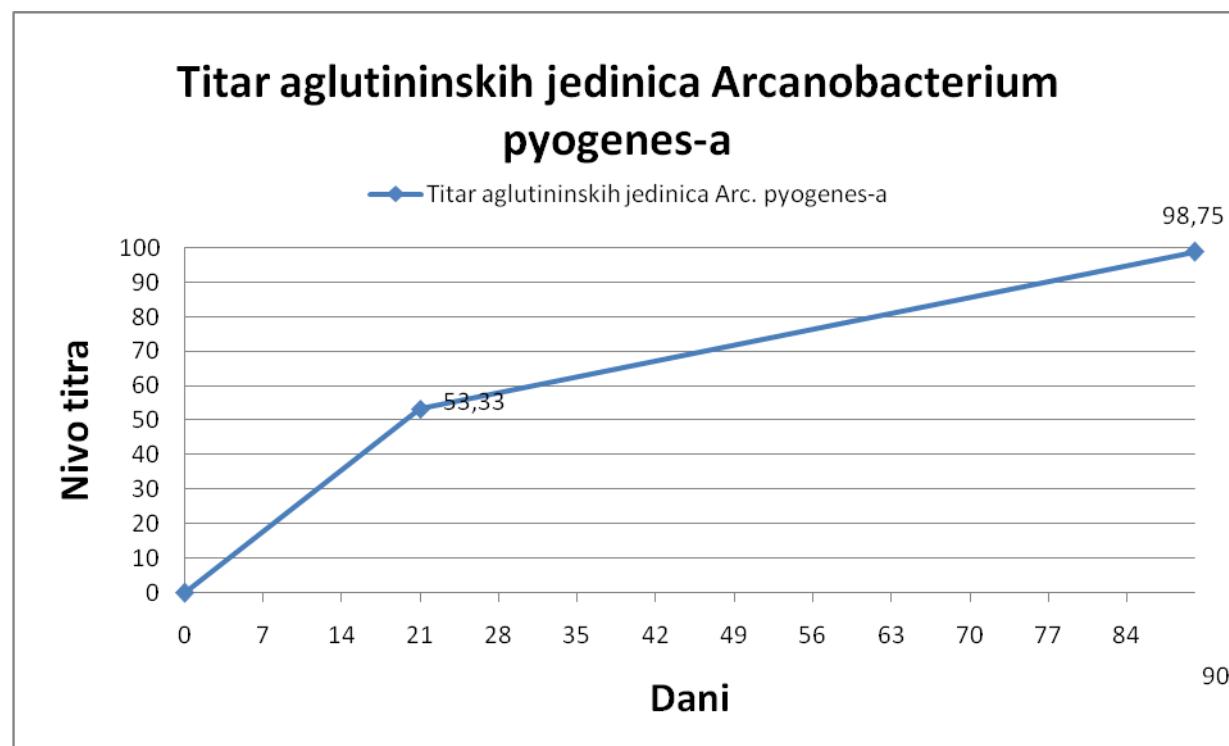


Tabela 4. nalaz titra antitoksina Cl. perfringensa A koji je vršen nultog, dvadesetprvog i devedesetog dana od revakcinacije.

Br. vak. junica	Titar antitoksina Clostridium perfringensa A		
	na 0 dana	21. dana	90. dana
48	0	1,09	1,55

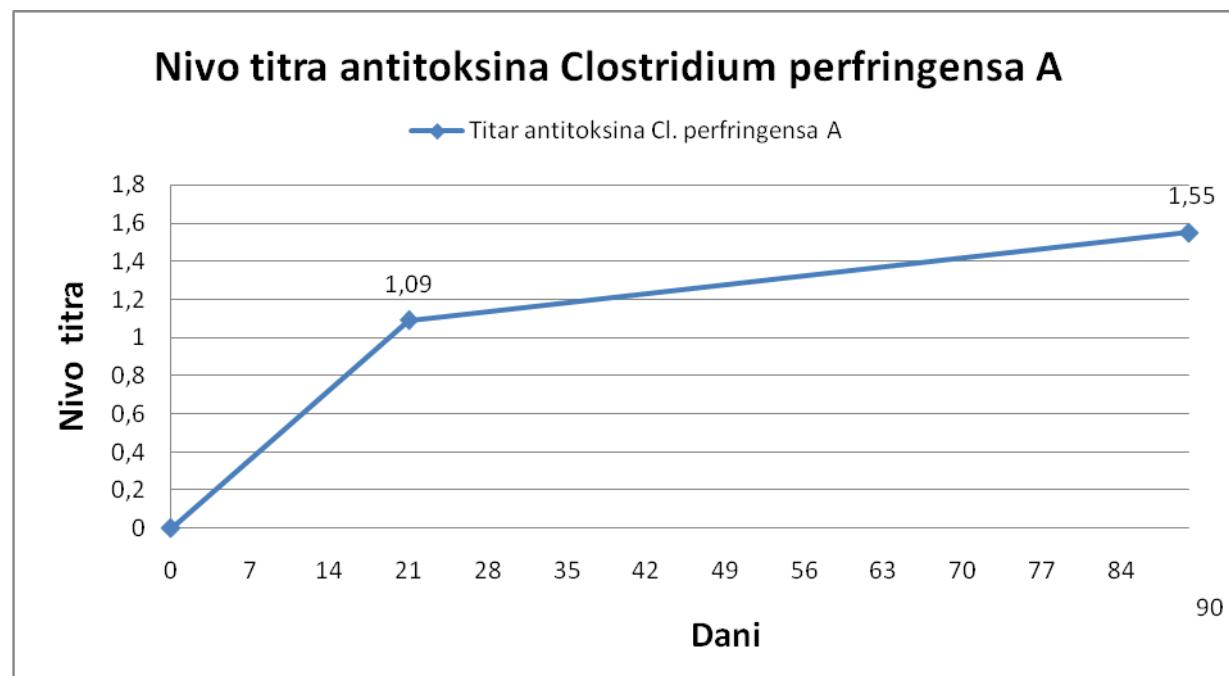
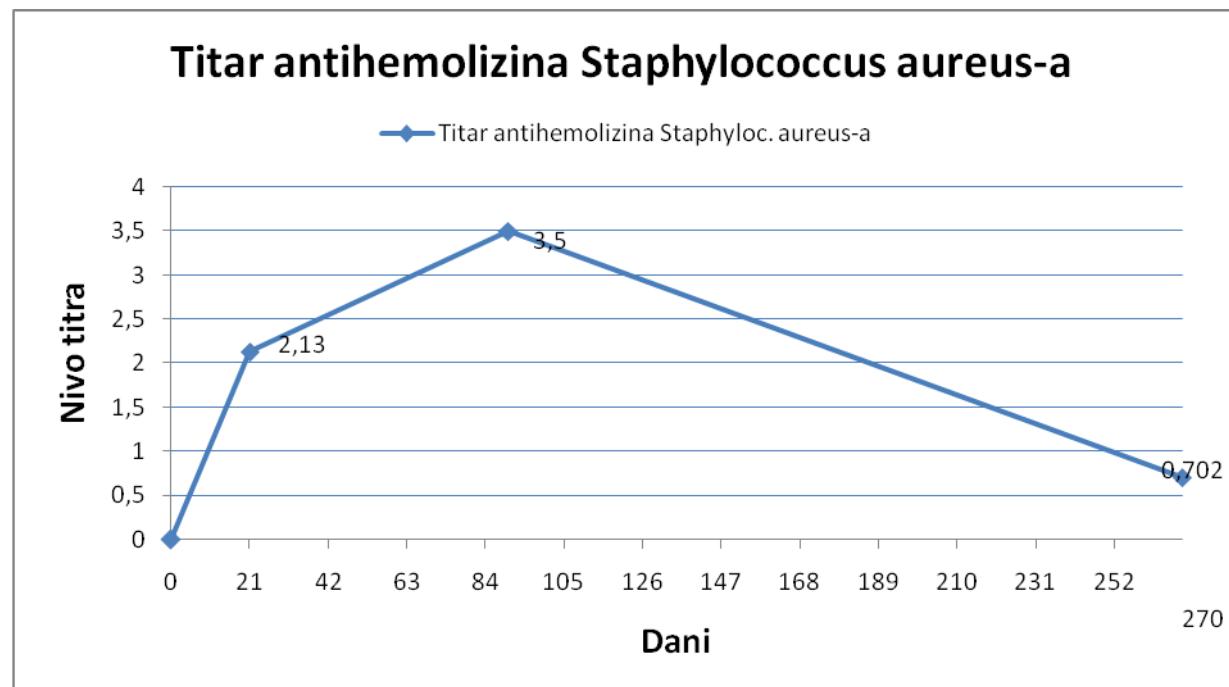


Tabela 5. nalaz titra antihemolizina Staphyloc. aureus-a koji je vršen nultog, dvadesetprvog, devedesetog i dvestasedamdesetog dana od revakcinacije.

Br. vak. junica	Titar antihemolizina Staphylococcus aureus-a			
	na 0 dana	21. dana	90. dana	270. dana
48	0	2,13	3,50	0,702



Sa gledišta biosigurnosnih mera, uvodjenje novih krava predstavlja rizik, ni jedna krava koja je inficirana kontagioznim uzročnikom mastitisa (Staph. aureus-om) ne bi smela biti uvedena u stado. Pored kontrolisanja ulaska novih grla, potrebno je i vršiti mere higijene muzača, kao i mere kontrole poremećaja sekrecije vimena. Takav način praćenja možemo uraditi pomoću podataka iz tabele, koju bi svaka farma trebala da ima. Prikupljeni podaci sa farme prikazani u tabeli 6 imaju za cilj da veterinarskoj službi ukažu kakve će se biosigurnosne mere sprovoditi tokom laktacije i zasušnog perioda da bi postojeći problem držao pod kontrolom.

Tabela 6. Kontrola zdravlja vimena u laktaciji i zasušnom periodu.

Problem	Nevažno	Umereno važno	Vrlo važno	Ne znam
Infekcija kontagioznim uzročnicima pre prvog partusa			x	
Infekcija uslovljenim uzročnicima pre prvog partusa		x		
Nova infekcija uslovljenim uzročnicima između zasušenja i partusa			x	
Nova infekcija uslovljenim uzročnicima tokom laktacije		x		
Nova infekcija kontagioznim uzročnicima tokom laktacije			x	
Mnogo krava u II.+ laktaciji sa starim infekcijama kontagioznim uzročnicima			x	

Te mere podrazumevaju primenu terapija svih kliničkih mastitisa krava u laktaciji i svih kliničkih mastitisa uzrokovanih kontagioznim uzročnicima u laktaciji. Dok kod teških kontagioznih mastitisa gde efekat terapija nije davao željene rezultate, tu pristupiti merama imunoprofilakse sa svih krava u stadu u periodu zasušenja autohtonih vakcinama.

6.0. Diskusija

Stafilocokne infekcije u vimenu dovode do kataralno-gnojnog mastitisa i galaktoforitisa, koji potiču hronično ili akutno, sa različitim kliničkim i patološko anatomske promenama, čiji je najčešći uzrok *Staphylococcus aureus*, ređe *Staphylococcus epidermidis*. *Staphylococcus aureus* ubraja se i u uzročnike subkliničkih mastitisa (Boboš,2005).

Heckmann et all. (1981) ukazali su na značaj opreme za mužu kao izvor uzročnika. Oni su pomoću ispitivanja elektronskim mikroskopom često nalazili pore i komadiće dlačica na površini gumice koje se koriste prilikom muže. *staphylococcus aureus* je tom prilikom bio daleko najčešće izolovan mikroorganizam i pretežno se radilo o sojevima rezistentnim na antibiotike.

Prema Navodima Stojanovića i sar. (2001) mastitisi su i dalje najskuplja bolest muznih krava. Procjenjuje se da je najmanje 40% svih krava inficirano nekim od uzročnika mastitisa, ali svega 2-3 % boluje od kliničkog mastitisa. Ako posmatramo *Staphylococcus aureus* kao uzročnik, bilo je zahvaćeno 16-19% krava sa subkliničkim mastitisom (Stojanović, 1979).

Problemi koji se javljaju na farmama kao gangrenozni mastitisi nastaju usled infekcije *Staph. aureus*-om, koji se lečenjem ne može suzbiti iz razloga što ima sposobnost izbegavanja fagocitoze stvaranjem polisaharida koji oko sebe sadrži sluz i na taj način sprečava prepoznavanje. U parenhimu dolazi do stvaranja malih abscesa koji često prelaze u ožiljno tkivo koje stvara barijeru i tako štiti uzročnika od imunog sistema krave kao i od dejstva antibiotika prilikom lečenja. Infekcija se razvije kao hronični subklinički mastitis koji zbog dugog vremena inkubacije ostaje često dugo bez kliničkih manifestacija. Tokom šestogodišnjeg perioda praćenja gangrenognog mastitisa, u tabeli broj 1 možemo videti broj obolelih krava i broj krava koje su prinudno zaklane. Prve godine je lečeno 11 krava, što iznosi 15 procenta od ukupnog broja krava, gde je nakon toga 8 krava bilo prinudno zaklano, a 3 krave su uginule. Naredne godine je lečeno 18 krava, gde je procenat iznosio 25 procenata. 11 krava je prinudno zaklano, a 7 uginulo. Treće godine je lečeno 9 krava, 5 je prinudno zaklano, 2 krave su uginule, dok su 2 krave ostale žive, jer je njima hirurškim putem otklonjeno vime. Četvrte godine od 5 lečenih krava 1 je prinudno zaklana, a 5 krava je uginulo. U petoj godini 3 krave su lečene, od kojih je 11 krava prinudno zaklano, dok su 2 krave uginule. šeste godine

su 2 krave lečene, 6 krava je prinudno zaklano, a 2 krave su uginule. Efekat lečenja gangrenoznog mastitisa antibiotskom terapijom nije davao zadovoljavajuće rezultate,tabela 1. Dve krave su bile izlečene tako što je hirurškom mameektomijom odstranjeno kompletno vime krave, ali zbog ekonomske neisplativosti, takav način lečenja se ne primenjuje, već se obolela gbla šalju na ekonomsko klanje. Iz tog razloga smo postupkom vakcinacije štalskom (autohtonom) vakcinom uspeli podići nivo antitela na odgovarajuć nivo i na taj način smanjiti broj obolelih gla, kao i dalje širenje bolesti. U tabeli broj 2 možemo uočiti da se kod vakcinisanih krava gangrenozni mastitis kod prvostrukke javi tek nakon 156 dana, dok se kod krava koje nisu vakcinisane javlja već nakon 11,6 dana. Tabele broj 3,4,5 nam ukazuju na nivo titra aglutininskih jedinica, Arc. pyogenes-a, antitoksina Cl. perfringensai i antihemolizina Staph. aureus-a, gde uočavamo da titar raste do 90-og dana, a kod ispitivanja titra antihemolizina Staph. aureusa 270 dana nakon vakcinacije vidimo da titar i dalje postoji. U vreme kada titar kreće da opada potrebno je izvršiti ponovnu vakcinaciju, kojom ćemo titar podići na odgovarajući nivo i zaštiti populaciju krava za naredni period.

7.0. Zaključak

Analizirajući pojave gangrenoznog mastitisa na jednoj farmi visoko produktivnih krava utvrdili smo da se:

- Gangrenozni mastitis u šestogodišnjem periodu dijagnostikovao klinički kod 73 krave.
- Pojavljivanje gangrenoznog mastitisa najčešće je bilo postpartalno i to u prvom mesecu laktacije.
- Sve obolele krave su uginule ili prinudno zaklane, izuzev dve kod kojih je vršeno odstranjenje kompletног vimena hiruškim putem.
- Primenom autohtone vakcine kod visoko gravidnih junica i prvotelki postignuta je željena imuno zaštita i od 48 vakcinisanih grla samo je jedna junica obolela 156 dana od revakcinacije.
- Nivo titra antihemolizina *Staphylococcus aureus* kod prvoatelki bio je dokazan i 270 dana nakon revakcinacije.

8.0. Literatura

1. Anderson K.L.: Therapy for acute coliform mastitis. Comp.cont.educ.11, 1125-1133, 1989.
2. Blank I.H.; Further observations on factors with influence the weather content of the stratum corneum. J.Investigative Dermatol.21, 259-271, 1953.
3. Boboš S, Vidić B.: Mlečna žlezda preživara, Novi Sad.
4. Boboš S, Vidić B.: Preventiva i terapija mastitisa. Simpozijum. Mastitis i kvalitet mleka. Vrnjačka Banja, 2001.
5. Burrenich C.J., Detilleux Paape A.M., Massart-Lee: Physiological and genetic factors that influence the cow resistance to mastitis, especially during early lactation. Symposium on Immunology of Ruminant mammary Gland. Proceedings, 9-20, 2000.
6. Campros M., Godson D., Hughes H., Babink L. : The role of Biological Response Modifiers in Disease Control. J Dairy Sci.76, 2407-2417, 1993.
7. Finlay B.: Cell adhesion and invasion mechanisms in pathogenesis. Current Options in Cell Biology, 815-820, 1990.
8. Frerking H.: Zur Feststellung von Enterstorungen und Enteren-t zundungen in Vorzugsmilchbatrie ben unter Verwendung geeigneter Laboratoriumsverfahren. Vet.med.Diss, Hanover, 1961.
9. Gruneth E.: Buiatrik. Verlag Schäpe, Hanover, 1996.
10. Hamman J.: Teat tissue resistance mechanisms with special regard to machine milking. Symposium on Immunology of Ruminant mammary Gland, Proceedings, 102-111, 2000.
11. Harmon R.: Neutrophil leukocyte as a source of lactoferrin in bovine milk. Am.J.Vet.Res. 41, 1603-06, 1980.
12. Hibbitt KG, Graven N, Batten EH: Anatomy, Physiology and Immunology of the Udder, in Andrews HA, editor Bovine medicine, diseases and husbandry of cattle. Blackwell Publishing Company, 311-325, 2004.

13. Hillerton J.E.: Summer mastitis- the current position. In Practis 10 (2), 131-137, 1988.
14. Katić V. i sar: Veterinarski glasnik,3-4,299-308, 1990.
15. Katić V.R., Boboš S., Jurca J.: Značaj preventivnih mera u suzbijanju mastitisa. Veterinarski glasnik, vol. 44, 3-4, 299-308, 1990.
16. Kehrli Jr. M.E., Cullor J.S., Nickerson St.C.: Immunobiology of hematopoietic colonystimulating factors: potential application to disease prevention in the bovine. Journal of Dairy Sci. 74, 1991.
17. Konig E.H., Liebich G.H.: Veterinary Anatomy of Domestic Mammals, Schattauer, Stuttgart, 2004.
18. Legrand D, Elass E, Pierce A, Mazurier J.; Lactoferrin and host defence: on overview of its immune-modulating and anti-inflammatory properties, Biometals, 17, 225-9, 2004.
19. Leitner G., Lubashevski E., Trainin Z.: Staphylococcus aurens vaccine against mastitis in dairy cows composition and evaluation of its immunogenicity in mouse model. Vet.Immunol.Immunopathol., 20,93 (3-4), 153-8, 2003.
20. Lee C., Wooding FBP., Kemp P., Identification propertic and differential counts of cell population using electron microscopy of dry cows secretions, colostrums and milk from normal cows. J.Dairy Res. 47 ,39-50, 1980.
21. Miljković Z., Momcilovic M., Miljkovic D., Mostarica-Stojkovic M.: Methylprednisolone inhibits IFN-gamma and IL-17 expression and production by cells infiltrating central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis. J. Neuroinflammation. 6: 37, 2009.
22. Nickerson S.C.: Immune mechanism of the bovine udder an overview. J.Am.Vet.Med.Assoc.Jul., 187 (1), 41-45, 1985.
23. Pavlović V.i sar.: Preventiva i terapija mastitisa krava. Simpozijum "Mastitisi i kvalitet mleka", Vrnjačka banja, 2001.
24. Pantić, B. : Embriologija, Beograd, 1990.
25. Pantić, B. : Histologija, Beograd, 1995.
26. Pillai S.R., Kunze E., Sordillo L.M. Jayarao B.M.: Application of differential
27. Inflammatory cell count as a tool to monitor udder health. J. Dairy Sci., 84: 1413-1420, 2001.
28. Pyorala S.: Antimicrobial treatment of mastitis- choice of the route of administration and efficacy. Proceedings of the British Mastitis Conference, Brockworth 20-29, 2002.

29. Raab, W.: Skin cleansing in health and disease. *Weiner Medizinische Wochenschrift.* 17 (Supplement 108): 4-9, 1990.
30. Rainard, P., Poutrel B.: Effect of naturally occurring intramammary infections by minor pathogens on new infections by major pathogens in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 49:327, 1988.
31. Sanchez, H.S., Ford C.W., Yancey R.J.: Evaluation of antibiotic effectiveness against *Staphylococcus aureus* surviving within the bovine mammary gland macrophage. *J. Antimicrob. Chemoth.* 21: 773-786, 1988.
32. Schalm O.W.: *Bovine mastitis*, Philadelphia, USA, 1971.
33. Schuster D.E., Kchirli M.E., Rainard P., Paape M.: Complement fragment C5a and inflammatory cytokines in neutrophilic recruitment during intramammary infection with *E.coli*. *Infect.Immun.* 65, 3286-92, 1997.
34. Smith K.,L., Todhunter D.A.: Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. *J.Dairy Sci.* 68, 1531-1553, 1985.
35. Stanojević S., Krnjačić D.: Gljivični mastitisi goveda. Simpozijum "Mastitis i kvalitet mleka", Vrnjačka banja, 2001.
36. Stojić V., Gvozdić D.: „Fiziologija i patofiziologija imunosti mlečne žlezde“, Simpozijum Mastitis i kvalitet mleka, Vrnjačka Banja, Zbornik radova, 21-37,2001.
37. Stojić V.: Veterinarska fiziologija. Naučna knjiga, Beograd, 2004.
38. Tizard R.I.: Veterinary Immunology. ISBN-7216-5772-9, 1996.
39. Tyler J.W. at al.: Treatment of subclinical mastitis. *Vet.Clin.North Am Food. Animal Practis.* 8(1), 17-28, 1992.