

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Mr Vladimir B. Magaš

**PRIPREMA, ISPITIVANJE
IMUNOGENOSTI I OCENA EFIKASNOSTI
VAKCINE U PROFILAKSI NASTANKA
MASTITISA KOD KRAVA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2012.

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Mr Vladimir B. Magaš

**PRIPREMA, ISPITIVANJE
IMUNOGENOSTI I OCENA EFIKASNOSTI
VAKCINE U PROFILAKSI NASTANKA
MASTITISA KOD KRAVA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2012.

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Mr Vladimir B. Magaš

**PREPARATION, IMMUNOGENICITY
TESTING AND EVALUATION OF
EFFICIENCY OF VACCINES IN THE
PROPHYLAXIS OF MASTITIS IN COWS**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2012.

Mentor:

Dr Vojislav Pavlović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine
Katedra za porodiljstvo, sterilitet i veštačko osemenjavanje

Članovi komisije:

Dr Vojislav Pavlović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine
Katedra za porodiljstvo, sterilitet i veštačko osemenjavanje

Dr Velibor Stojić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine
Katedra za fiziologiju

Dr Slobodanka Vakanjac, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine
Katedra za porodiljstvo, sterilitet i veštačko osemenjavanje

Dr Branko Velebit, naučni saradnik
Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd

Dr Branislav Lako, redovni profesor
Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

Datum odbrane:

PRIPREMA, ISPITIVANJE IMUNOGENOSTI I OCENA EFIKASNOSTI VAKCINE U PROFILAKSI NASTANKA MASTITISA KOD KRAVA

REZIME

Zapaljenje mlečne žlezde, mastitisi krava, 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 preduzimanje preventivnih i terapijskih mera u cilju smanjenja nastanka mastitisa.

Stafilokoke mogu u akutnoj formi da izazovu teške, maligne mastitise, u vidu granulomatoznih i nekrotičnih promena. Hronične forme stafilokoknog mastitisa uglavnom prolaze kao subklinički oblici obolenja mlečne žlezde. Najčešći prouzrokovajući 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. Stafilokoke, kao i streptokoke, su veoma slabi antigeni, što dodatno otežava pronalazak efikasne vakcine. Iz tih razloga još uvek nije pronađena komercijalna efikasna vakcina protiv mastitisa izazvanih bakterijama *S. aureus* i *Str.agalactiae*, ali primena autohtonih vakcina u preveniranju mastitisa može dati zadovoljavajuće rezultate.

Opisane su inaktivisane vakcine koje se sastoje od celih ili delova bakterijskih ćelija i njihovih toksoida. U pravljenju vakcina protiv mastitisa izazvanog *S. aureus*-om novina je dodavanje proteina A i *fibronectin-binding* proteina kao celularnih antigena. Sasvim nov pristup imunizaciji mlečne žlezde predstavlja inkorporacija lizata *S. aureus* u biorazgradive partikule koje imaju funkciju da stimulišu produkciju i opsonizaciju antitela. Uzimajući u obzir rezultate drugih istraživača i sopstvena preliminarne istraživanja, a imajući u vidu problem koji predstavljaju mastitisi izazvani bakterijama *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus agalactiae*, cilj

istraživanja je bio priprema i ispitivanje vakcine čija bi se efikasnost ogledala u smanjenju nastanka kliničkih i subkliničkih mastitisa izazvanih navedenim uzročnicima.

U izvedenom eksperimentu korišćena je autohtona vakcina koja je pripremljena od *S. aureus* SAU 7 i *Str. agalactiae* SAG 3, izolovanih iz mleka krava sa ogledne farme. Eksperimentalnoj grupi 1 aplikovana je vakcina dva meseca i revakcina mesec dana pred teljenje, a eksperimentalnoj grupi 2, vakcina je aplikovana mesec dana pred porođaj, a revakcina dva meseca posle porođaja. Vakcina je aplikovana subkutano u regiju vrata u dozi od 5 ml, a sastojala se od inaktivisanih bakterijskih ćelija *S. aureus* SAU 7 u količini od 1×10^{10} cfu/ml i *Str. agalactiae* SAG 3 u količini od 4×10^9 cfu/ml.

Koncentracija antistafilokoknih, kao i antistreptokoknih antitela G klase, u mleku krava vakcinisanih mesec dana pre teljenja, a revakcinisanih dva meseca posle teljenja je bila značajno veća u odnosu na vrednosti kod kontrolne grupe. Aktivacija humoralnog imunološkog odgovora kod krava koje su vakcinisane antepartalno, a revakcinisane postpartalno je daleko izraženija, nego kod krava koje su vakcinisane i revakcinisane u antepartalnom periodu.

Ključne reči: mastitis, krava, vakcina, *S. aureus*, *Str. agalactiae*, imunoprofilaksa

Naučna oblast: Klinička patologija i terapija životinja

Uža naučna oblast: Ginekologija sa andrologijom

UDK broj : 616:636.2:618.19-002

PREPARATION, IMMUNOGENICITY TESTING AND EVALUATION OF EFFICIENCY OF VACCINES IN THE PROPHYLAXIS OF MASTITIS IN COWS

SUMMARY

Inflammation of the mammary gland, mastitis in cows, 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.

In the literature there are descriptions of inactivated vaccines consist of bacterial particules or entire cells and their toxoid. A new opportunity in making a vaccine against mastitis caused by *S. aureus* is adding protein A and fibronectin-binding protein as cellular antigens. An entirely new approach to immunization of the mammary gland gave incorporation of *S. aureus* lysate into biodegradable particles that have a function to stimulate production and opsonisation of antibodies. Given the results of other investigators and our own preliminary studies, and keeping in mind problem that mastitis caused by *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* represents, goal

of the research is the preparation and testing of vaccines whose effectiveness is reflected in the reduction of clinical and subclinical mastitis caused by these pathogens.

In our study we used the indigenous vaccine that we prepared from *S. aureus* SAU 7 and *Streptococcus agalactiae* SAG 3 isolated from milk taken from the experimental farm. Experimental group 1 was vaccinated two months before calving, and revaccinated one month before calving, and experimental group 2, vaccine was administered one month before calving, and revaccinated two months after calving. The vaccine is given at a dose of 5 ml and consisted of inactivated bacterial cells *S. aureus* SAU 7 in the amount of 1×10^{10} cfu/ml and *Str. agalactiae* SAG 3 in the amount of 4×10^9 cfu/ml.

Concentration of antistaphylococcal and antistreptococcal class G antibodies in milk of cows vaccinated one month before calving, and revaccinated two months after calving was significantly higher than in control group of cows. Activation of the humoral immune response in cows that are vaccinated antepartal, and revaccinated postpartum is far more pronounced than in cows that were vaccinated and revaccinated in the antepartal period.

Key words: mastitis, cows, vaccines, *S. aureus*, *Str. agalactiae*, immunoprophylaxis

Scientific field: Clinical pathology and therapy of animals

Field of academic expertise: gynecology with andrology

UDK number: 616:636.2:618.19-002

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Pregled literature	4
2.1. <i>Morfologija i fiziologija mlečne žlezde</i>	4
2.1.1. Morfologija mlečne žlezde	4
2.1.2. Fiziologija mlečne žlezde	8
2.2. <i>Fiziologija imunosti mlečne žlezde</i>	10
2.3. <i>Podela mastitisa</i>	17
2.4. <i>Profilaksa i terapija mastitisa</i>	23
2.4.1. Profilaksa mastitisa	23
2.4.2. Terapija mastitisa	24
2.4.3. Morfološke i biohemijske osobine <i>Staphylococcus aureus</i>	26
2.4.4. Morfološke i biohemijske osobine <i>Streptococcus agalactiae</i>	30
2.5. <i>Imunoprofilaksa mastitisa</i>	33
2.5.1. Imunoprofilaksa mastitisa izazvanih bakterijama <i>Staphylococcus aureus</i> i <i>Streptococcus agalactiae</i>	34
2.5.2. Monitoring kliničkih i subkliničkih mastitisa izazvanih bakterijama <i>Staphylococcus aureus</i> i <i>Streptococcus agalactiae</i>	48
3. Cilj i zadaci istraživanja	53
4. Materijal i metode	54
4.1. <i>Ispitivanje uzoraka mleka</i>	54
4.1.1. Bakteriološko ispitivanje uzoraka mleka	54
4.1.2. Izolovanje i identifikovanje vakcinalnog soja <i>S. aureus</i>	54
4.1.2.1. Dokazivanje kaogulaze	55
4.1.2.2. Dokazivanje DNA-aze	55
4.1.2.3. Dokazivanje alkalne fosfataze	55
4.1.2.4. Dokazivanje ureaze	56
4.1.2.5. Fermentacija manitola	56
4.1.2.6. Proba katalaze	56
4.1.2.7. Oskidativno-fermentativni test	56

4.1.2.8. Osetljivost rasta mikroorganizama na novobiocin i polymyxin B --	57
4.1.2.9. Dokazivanje hemolize -----	57
4.1.3. Izolovanje i identifikovanje vakcinalnog soja <i>Streptococcus agalactiae</i>	57
4.1.3.1. CAMP test, test za identifikaciju streptokoka -----	57
4.2. Priprema vakcine -----	58
4.2.1. I deo vakcine-----	59
4.2.2. II deo vakcine -----	59
4.2.3. Ispitivanje vakcine na sterilnost i netoksičnost -----	60
4.3. Citološka ispitivanja uzoraka mleka-----	60
4.4. Imunološka ispitivanja -----	61
4.4.1. Priprema ploča za indirektni ELISA test-----	61
4.4.1.1. Priprema antigena -----	61
4.4.1.2. Oslojavanje mikrotitar ploča (coating) -----	62
4.4.1.3. Blokiranje mikrotitar ploča (blocking) -----	63
4.4.2. Radni protokol za indirektni ELISA test -----	63
4.4.2.1. Priprema uzoraka -----	63
4.4.2.2. Inokulacija uzoraka -----	64
4.4.2.3. Adicija konjugata-----	64
4.4.2.4. Adicija supstrata -----	64
4.4.2.5. Adicija stop rastvora i merenje apsorbance-----	64
4.4.2.6. Određivanje cut-off vrednosti indirektnog ELISA testa -----	65
4.5. Eksperimentalni dizajn-----	67
4.6. Ispitivanje broja somatskih ćelija i antitela u mleku prvotelkinja -----	67
4.7. Statistička obrada podataka -----	68
5. Rezultati istraživanja -----	69
5.1. Rezultati praćenja opšteg zdravstvenog stanja vakcinisanih krava -----	69
5.2. Rezultati mikrobioloških ispitivanja mleka u vakcinisanim grupama i kontrolnoj grupi krava obolelih od kliničkih i subkliničkih mastitisa -----	70
5.3. Rezultati ispitivanja broja somatskih ćelija u mleku kontrolne i vakcinisanih grupa krava -----	71
5.4. Rezultati nivoa antistafilokoknih antitela u mleku -----	73
5.5. Rezultati nivoa antistreptokoknih antitela u mleku -----	83

6. Diskusija	100
6.1. <i>Opšte zdravstveno stanje vakcinisanih krava</i>	100
6.2. <i>Mikrobiološko ispitivanje mleka krava obolelih od kliničkog i subkliničkog mastitisa</i>	100
6.3. <i>Broj somatskih ćelija u mleku oglednih grupa krava</i>	102
6.4. <i>Antistafilokokna i antistreptokokna antitela u mleku</i>	103
7. Zaključci	109
8. Spisak literature	110

1. UVOD

Zapaljenje mlečne žlezde ili mastitis krava, predstavlja jedan od najaktuelnijih problema u intenzivnoj proizvodnji mleka, koji nanosi velike ekonomske gubitke i koji se poslednjih godina, čak i u razvijenim zemljama, javlja u visokom procentu, od 20 do 80%. Dugogodišnji različiti pristupi lečenju mastitisa nisu dali odgovarajuće rešenje, pa je problem mastitisa i dalje prisutan i aktuelan. Sprečavanje prodora patogenog uzročnika u mlečnu žlezdu, njegovo naseljavanje i razmnožavanje, nameću stalnu potrebu za redovnim kontrolama mleka, kao i preduzimanje preventivnih i terapijskih mera u cilju smanjenja pojave nastanka mastitisa. Smatra se da tri činioca imaju osnovnu ulogu u nastanku mastitisa, a to su: nehigijensko držanje i ishrana, nepravilna eksploatacija, a posebno muža i infekcija kao neposredan uzrok pojave mastitisa.

Mastitisi krava se javljaju u kliničkom i subkliničkom obliku. Klinički oblik može da ima perakutni, akutni, subakutni i hronični tok bolesti. Najčešća forma hroničnog mastitisa je subklinički mastitis. Otkrivanje kliničkog mastitisa, po pravilu, ne predstavlja problem, s obzirom na jasno izražene znake zapaljenja. Klinički tok bolesti ipak je dosta redak i na godišnjem nivou obuhvata 3-5% krava u zapatu. Prisustvo subkliničkog mastitisa, kod krava koje ne pokazuju simptome bolesti, utvrđuje se nalazom patogenih bakterija u uzorcima mleka.

Ispunjavanje osnovnih zoohigijenskih i zootehničkih uslova u zapatima muznih krava podrazumeva svakodnevnu kontrolu vimena i prevenciju mastitisa, a postiže se svakodnevnom obaveznom pranjem vimena pre muže, kao i pravilnom ručnom ili mašinskom mužom, uz neizbežno potapanje sisa u dezinficijens posle muže. Nepravilna ručna, kao i mašinska muža aparatima sa neispravnim pulzatorom ili lošim vakumom, otvara mogućnost infekcije mlečne žlezde i nastanak mastitisa. Potapanje sisa u dezinficijens posle muže značajno smanjuje broj bakterija u sisnom kanalu i na taj način smanjuje mogućnost njihovog prodora u vime.

Kao preventivna mera podrazumeva se i terapija krava u zasušenju koja podrazumeva lokalnu aplikaciju antibiotika nakon poslednje muže. Terapija krava u zasušenju treba u narednoj laktaciji da obezbedi što duži period neinficiranosti vimena, a obavezna je kod dijagnostikovanih subkliničkih mastitisa izazvanih sa *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus agalactiae*.

Cilj antibiotske terapije je da uništi patogene mikroorganizme, a da ne izazove oštećenja na mlečnoj žlezdi. Eliminacija mikroorganizama iz vimena zavisi od koncentracije i vrste antibiotika, kao i od načina primene i vremena aplikacije. Subkliničke mastitise izazvane sa *Streptococcus agalactiae* (*Str. agalactiae*) i *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) neophodno je lečiti odmah po otkrivanju. Subklinički mastitisi izazvani sa *Str. agalactiae* uspešno se leče preparatima na bazi penicilina ili eritromicina. Terapija se primenjuje samo lokalno, dva puta dnevno, u dobro izmuženu obolelu četvrt. Subklinički mastitis izazvan sa *S. aureus* takođe treba lečiti lokalno, preparatima na bazi aminoglikozida, tri do pet dana, mada je uspešnost ove terapije veoma mala i iznosi negde oko 40%. Terapiju kliničkih mastitisa treba prvenstveno usmeriti prema simptomima bolesti. Antibiotska terapija se kod kliničkih mastitisa sprovodi parenteralno i lokalno uz istovremenu intravensku primenu glukoze, elektrolita i vitamina.

Lokalna i parenteralna terapija antibioticima, kao i primena odgovarajućih zoohigijenskih i zootehničkih mera, pravilna muža i ishrana, smanjuju pojavu mastitisa i daju odgovarajuće rezultate. I pored svega, problem mastitisa je i dalje prisutan u intenzivnoj proizvodnji mleka, pa je bilo nepohodno da se rešenja traže u modernijim pristupima, a to su imunoprofilaksa i imunoterapija, koja je usmerena na pronalaženje efikasnih vakcina protiv nekih najčešćih uzročnika mastitisa.

Radovi iz oblasti vakcinisanja preživara protiv uzročnika mastitisa ukazuju na ograničen uspeh u dobijanju značajnijih rezultata imunoprofilakse. Još pre 80 godina je ustanovljeno da subkutano inokulisana živa kultura *S. aureus* kod ovaca dovodi do znatne otpornosti na eksperimentalno izazivanje stafilokoknog mastitisa. Nedavno je potvrđeno da su žive vakcine pripremljene od *S. aureus* bile efikasne protiv uzročnika eksperimentalno izazvanih mastitisa ovaca, dok s druge strane, mrtve vakcine nisu davale zaštitu. Imunoprofilaksa protiv uzročnika mastitisa tokom sedamdesetih godina prošlog veka temeljena je na polivakcinama, koje su u svom sastavu imale imunogene sojeve stafilokoka, streptokoka i koliformnih bakterija, egzotoksine i endotoksine. Polivalentne vakcine nisu se u praksi pokazale kao uspešne, pa je napušten taj sistem proizvodnje vakcina i otpočela je proizvodnja monovalentnih vakcina, koje su dale mnogo bolje rezultate. Vakcina protiv *Staphylococcus aureus* sadrži inaktivisane ćelije *S. aureus* (Giraud 1997, Hoedermaker 1999), kao i inaktivisane ćelije *Str. agalactiae*

(Giraud 1997). Veliki broj radova ukazuje da se u cilju poboljšanja vrednosti vakcine inaktivisanim bakterijama *S. aureus*, dodaju alfa i beta toksoidi, kao i delovi kapsule ovog uzročnika (Calzolari 1997, Watson 1996). Keskin i sar. (2007) u svom radu opisuju efekte komercijalne vakcine koja u svom sastavu ima inaktivisane sojeve *S. aureus* TC5, *S. aureus* TC8, *E. coli*, *Str. agalactiae*, *Str. uberis*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa* i *A. pyogenes*.

Premda sve ove vakcine pokazuju značajan eksperimentalni uspeh, koji se ogleda u povećanju titra antitela u serumu, ali ne i u mleku, kao i u smanjenju pojave kliničkih i subkliničkih mastitisa među ogleđnim kravama ili u vakcinisanim zapačima, smatra se da je primena imunoprofilakse u lečenju zapaljenja vimena još uvek nedovoljno istraženo polje naučnog rada. Mnogi naučnici se i dalje bave problematikom proizvodnje vakcine protiv bakterijskih uzročnika mastitisa, ali složenost građe i aktivnosti same mlečne žlezde, kao i specifičnost propustljivosti barijere krv-mleko, smanjuju uspešnost postizanja značajnog uspeha na polju ovih istraživanja.

S obzirom na rezultate drugih istraživača i sopstvenih preliminarnih istraživanja, a imajuću u vidu problem koji predstavljaju mastitisi izazvani sa *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus agalactiae*, cilj istraživanja je bio priprema i ispitavanje vakcine čija bi se efikasnost ogledala u smanjenju nastanka kliničkih i subkliničkih mastitisa izazvanih navedenim uzročnicima.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Morfologija i fiziologija mlečne žlezde

2.1.1. Morfologija mlečne žlezde

Mlečna žlezda (*glandula lactifera, mamma, uber, mastos*) je složena tubulo-alveolarna kožna žlezda i pripada redu žlezda apokrinog tipa sekrecije. Karakteristična je za rod sisara i njena primarna uloga je sinteza mleka u ishrani novorođenčadi.

Kod ženskih jedinki mlečna žlezda predstavlja jednu od sekundarnih polnih odlika, a kod muških ostaje po pravilu celog života u rudimentisanom stanju - *mamma masculina* (lažne ili pseudosise). Lažne ili pseudosise su bez žlezdane podloge i kanala. Mlečna žlezda ima izgled jedinstvenog organa, i kod preživara se nalazi između zadnjih nogu u vidu kompaktnog, poluokruglog parnog organa. Vime krave čine četiri mamarna kompleksa, smeštenih u ingvinalnoj regiji ventralne strane kaudalnog dela tela. Mamarni kompleks se sastoji iz žlezdanog tela - *corpus mammae* i sise - *papilla mammae*, a u oba dela se nalazi zajednički sistem kanala.

Žlezdano telo - *corpus mammae*, sastoji se od žlezdanog epitela i intersticijalnog vezivnog tkiva sa nervima, krvnim i limfnim sudovima.

Vime krave je podeljeno na dve polovine - levu i desnu, a svaka se sastoji iz dve mlečne žlezde, jedne kranijalne i jedne kaudalne, sa po jednom sisom. Podela vimena na četvrti spolja je slabo uočljiva. Funkcionalno svaka polovina vimena krave može da se podeli na prednju i zadnju četvrt, pri čemu svaka četvrt samostalno i nezavisno funkcioniše. Govori se o dvema prednjim i dvema zadnjim četvrtima, pri čemu se veoma često konstatuje da su zadnje četvrti bolje razvijene od prednjih. Prednje sise su duže od zadnjih i njihova dužina iznosi 7-9 cm, a zadnjih 5-7 cm. Kako mamarni kompleksi međusobno ne komuniciraju, zapaljenski proces na jednom kompleksu ne može da se prenese na drugi.

Spolja, vime je prekriveno finom, mekom i elastičnom kožom, koja je prekrivena retkom dlakom. Od spoljašnjih uticaja, vime je zaštićeno kožom, koja na spoljašnjem otvoru sisnog kanala prelazi u sluzokožu. Na sisama, koža je grublja nego na vimenu i srasla je sa podlogom. Osnovna uloga kože je da pokriva vime i da štiti

unutrašnjost mlečne žlezde. Vime je za ventralni deo trbušnog zida fiksirano pomoću kože, površne i duboke fascije i *ligamentum suspensorium*, a fibro-elastično tkivo levog i desnog suspenzornog ligamenta onemogućava istežanje, kada je 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 najvažniji je deo suspenzornog sistema kod goveda. Izgrađen je od elastičnog i fibroznog vezivnog tkiva, ima sposobnost da se istegne kada se žlezda puni mlekom, omogućavajući tako promene u veličini i masi mlečne žlezde. Ova struktura delimično odvaja levu od desne polovine vimena. Oštećenje ovog ligamenta dovodi do istežanja vimena i veće predispozicije za nastanak povreda, posebno sisa. Lateralni suspenzorni ligament sadrži više kolagena nego elastina i oblaže vime sa spoljašnje strane. Osim kože, vime je obavijeno i dvema fascijama - površnom i dubokom, odnosno tankom vezivno-tkivnom kaspulom.

Sa unutrašnje strane, telo vimena podeljeno je medijalnim žlebom - *sulcus intramammarius*, na levu i desnu polovinu vimena. Duboka fascija - *fascia profunda* prodire medijalno u vime i deli ga na dve polovine, obavija ga sa svake strane i predstavlja *ligamentum suspensorium uberis*. Površinska fascija - *fascia superficialis* neposredno je ispod kože sa kojom se spaja i predstavlja nastavak površinske fascije trupa, a *fascia profunda* - duboka fascija se odvaja od *fascia flava abdominis* - duboke fascije trupa u blizini bele linije (*linea alba*) i obavija vime ispod površinske fascije. Ispod fascije je kapsula, koja se sastoji iz vezivnog tkiva, koje sadrži elastična vlakna i dosta masnog tkiva. Vezivnotkivna kapsula se sastoji od intersticijuma - međuprostornog tkiva i parenhima - žlezdanog tkiva.

Od kapsule u parenhim vimena idu vezivnotkivni nastavci i dele ga na režnjeve - *lobuse* i režnjiće - *lobule*, koji čine osnovu mlečne žlezde. Ti nastavci predstavljaju intersticijum vimena, koji je iste građe kao i kapsula.

U intersticijumu leže krvni sudovi, nervi i odvodni kanali mlečne žlezde - *ductus lactiferi*. 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 se nalazi 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, koje leže na bazalnoj membrani. Između epitelnih ćelija i bazalne membrane su mioepitelne ćelije, specijalizovane mišićne ćelije koje se pod dejstvom oksitocina, koji se sintetise u neurosekretornim ćelijama hipotalamusa, i deponuje se u neurohipofizi, kontrahuju i posledično dovode do pojačanog lučenja mleka iz alveola (Adams, 1986).

Epitel mlečnih alveola je niskoprizmatičan u acinusima koji su relativno neaktivni, a u toku aktivnosti, odnosno sinteze mleka, je visokoprizmatičan, a apikalna površina citoplazme štrči u lumen alveola. U toku aktivne sekrecije, deo membrane sa jednim delom citoplazme sa apikalnog dela ćelije otpadne u lumen alveola (apokrini tip sekrecije).

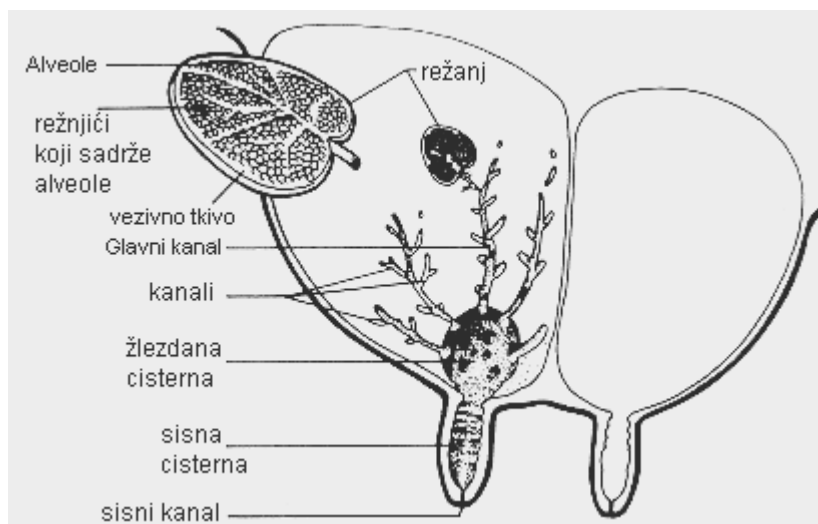
Alveole su opkoljene bogatom mrežom krvnih i limfnih kapilara. Imaju posebnu kožicu - *membrana propria*, obloženu ćelijama. Mleko se stvara u epitelnim ćelijama alveola, zbog čega se ove ćelije zovu mlečnim ćelijama i predstavljaju osnovne sekretorne jedinice mlečne žlezde. Meškovi imaju odvodne kanaliće - *ductuli lactiferi*, koji su položeni intralobularno. Ovi kanalići se međusobno udružuju i formiraju veće kanale - *ductus lactiferi*, koji su položeni interlobularno. *Ductus lactiferi* se ulivaju u mlečnu cisternu - *sinus lactifer*. Iz cisterne izlazi jedan ili više sisnih kanala koji vode mleko kroz sisu - *ductus papillaris*. Oni se završavaju malim otvorom na vrhu sise - *ostia papillaria*, kroz koje prilikom muže ili sisanja, mleko dospeva u spoljašnju sredinu.

Sise krave - *papillae mammae* su valjkaste i na njima nema dlaka, lojnih i znojnih žlezda. Veličina i oblik zavise od oblika i veličine vimena i proizvodnje mleka. Prednje su uglavnom duže od zadnjih. Imaju po jedan izvodni kanal - *ductus papillaris*, sa jednim otvorom - *ostium papillae*. Najpoželjnije su cilindrične sise, sa tupim i zaobljenim završetkom, jer omogućavaju pravilno i ravnomerno isticanje mleka iz vimena.

Kružni mišić - *m. sphincter* zatvara sisni kanal i na taj način se sprečava da mleko spontano curi iz napunjene cisterne ili između dve muže, a ima i ulogu barijere tj.

sprečava prodor bakterija u unutrašnjost vimena. Deo cisterne se nalazi i u sisi i zato se cisterna krave deli na žlezdani i sisni deo. Žlezdani je širi, a sisni uži.

Sisna cisterna (cisterna papile) - *sinus lactiferi seu papillaris* predstavlja nastavak žlezdane cisterne (cisterne vimena) - *sinus lactiferi seu glandularis*. U žlezdani deo cisterne se uliva 8 do 12 kanala žlezda, a funkcija cisterni je da deponuju mleko. Prelaz žlezdanog u sisni deo je označen prstenastim naborom sluzokože - Firstenbergova rozeta - mišićni sloj u unutrašnjosti sisnog kanala, čija je fiziološka uloga da u potpunosti zatvori sisni kanal između dve muže (Marković, 1982). U zidu ovog kanala je kružni sistem mišićnih ćelija i elastičnih vlakana - *m. sphincter papillae*, koji za vreme muže i sisanja omogućava da mleko prolazi mlazevima kroz sisni kanal u spoljašnju sredinu (Šijački, 1997),



Slika 1. Građa mlečne žlezde

[img]http://nongae.gsnu.ac.kr/~cspark/teaching/images/fig_10_1.gif[/img]

Vaskularizacija mlečne žlezde veoma je bitna kod krava u laktaciji jer svi prekurzori mleka vode poreklo iz krvi. Kod krava u laktaciji ukupan volumen krvi je 8% od ukupne zapremine krvi tela, a kod krava koje nisu u laktaciji je oko 7,4% (Shalm, 1971). Poželjno je da krvni sudovi na vimenu budu izraženiji, jer je potrebno 300-400 litara krvi da protekne kroz vime da bi se formirao 1 liter mleka. Da bi snabdevenost vimena hranljivim materijama koje se ugrađuju u mleko bila adekvatna, krvni sudovi koji dovode i odvođe krv iz vimena treba da su što većeg promera, kako bi se transformacija hranljivih materija iz krvi u mleko uspešno obavila.

Arterijski sistem - krv napušta srce i teče ka zadnjoj polovini tela kaudalno - abdominalnom aortom. Kada dođe do *regio pubis* prelazi u *Aa. iliaca communis*, od

kojih se odvajaju *Aa. iliacaе externaе* i *Aa. iliacaе internaе*. *Aa. iliacaе externaе* postaje *A. femoralis*, a od nje se odvaja *A. prepubica*, od koje se grana *A. abdominalis posterior* i *A. pudenda externa*. Ona prolazi kroz ingvinalni kanal i šupljinu tela. Napuštajući šupljinu tela *A. pudenda externa* postaje *A. mammaria*, od koje nastaju *A. mammaria anterior seu cranialis* i *A. mammaria posterior seu caudalis*, koje se nishodno dalje granaju u mlečnoj žlezdi.

Venski sistem - vene napuštaju mlečnu žlezdu paralelno sa arterijama. Postoje 3 vene, sa svake strane, koje odvođe krv iz vimena:

1. *V. pudenda externa* - napušta vime, paralelno sa *A. pudenda externa*;
2. *V. subcutis abdominis* - napušta žlezdu na gornjem kraju prednjih četvrtina i prolazi duž abdominalnog zida. Ova vena je velika i vidljiva na stomaku krave ispod kože, ulazi u šupljinu tela na *processus xiphoidea* i ulazi u *V. cava*;
3. *V. perinealis* - napušta zadnji deo žlezde paralelno sa *A. perinealis*.

Regionalni limfni čvorovi krave mogu se podeliti na površinske i duboke. Svi se oni ulivaju u supramamarne limfne čvorove i mogu se palpirati na bazi zadnjih četvrti vimena.

Mlečna žlezda je inervisana granama *n. spermaticus externus* ili *n. ingvinalis*, a u njoj se nalaze i vlakna *n. simpaticus* (Šijački, 1997; Marković, 1982).

2.1.2. Fiziologija mlečne žlezde

Po rođenju, u prvim mesecima, vime raste istom brzinom kao i telo (izometričan rast), a brži rast vimena u odnosu na telo počinje u uzrastu od 2-3 meseca (alometričan rast), kada proliferiše masno tkivo i kanali koji se u njemu granaju. U toku prvog graviditeta mlečna žlezda se intenzivnije razvija, na kraju bremenitosti učešće vezivnog i masnog tkiva se smanjuje na 40%, a tubulo-alveolarni sistem i alveolarne šupljine zauzimaju 60% (Hibbitt, 2004).

Začeci formiranja mlečnih žlezda uočavaju se već u embrionalnom periodu u vidu pupoljka pokožice u vezivu (krznu). Jedan deo pupoljka ostaje povezan sa pokožicom, 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. Od svakog mamarnog pupoljka razvije se posebna žlezdana struktura. Oko sedme nedelje graviditeta fetus je dugačak 9 cm i jasno se uočavaju četiri mamarna pupoljka, koji određuju mesto formiranja budućih četvrti vimena. Ponekad se mogu javiti dodatni mamarni pupoljci od kojih nastaju prekobrojne sise. Deobom epidermalnih ćelija ispod mamarnog pupoljka nastaje osnova primordijalnog sisnog kanala i sinusa. Kada embrion dostigne veličinu od 19 cm, primordijalna osnova sisnog kanala nešto je duža od sisa i na njenom unutrašnjem kraju se pojavljuje šupljina koja se širi u proksimalnom smeru. Ovo proširenje se postepeno sužava kada dosegne sloj epidermalnih ćelija na vrhu sise, dajući tako začetak budućeg sisnog kanala (Hibbitt, 2004). Kada fetus dostigne dužinu od 35 cm, diferencirano je više regiona buduće mlečne žlezde: ovalni prostor u proksimalnom delu ispunjen tečnošću, što predstavlja začetak budućeg sinusa mlečne žlezde, zatim nešto izduženi središnji deo, od kojeg nastaje sisni sinus, i uski sisni kanal, koji je još uvek prema spolja zatvoren keratinizovanim epitelnim ćelijama (Hibbitt, 2004). Dalje formiranje mlečne žlezde nastavlja se tako što se od epitela gornje površine mlečnog sinusa stvaraju sekundarni izdanci, koji se šire u dorzalnom pravcu, prorastajući sloj ćelija masnog tkiva. Kada se unutar sekundarnih izdanaka formiraju kanali, nastaje osnova za 10 i više glavnih mlečnih kanala. Iz mezenhima, koji se nalazi oko rudimentiranih žlezdanih kanalića, diferenciraju se krvni i limfni sudovi, manja količina glatko-mišićnog tkiva i fibro-elastična stroma, sa posebno razvijenim delovima, gde se formiraju suspenzorni ligamenti (Hibbitt, 2004). Neposredno uoči partusa, kod fetusa se formiraju tercijarni izdanci žlezdanog epitela, ali mlečna žlezda ostaje nerazvijena kod mladih životinja, sve do puberteta. Faktori koji utiču na razvije mlečne žlezde u toku intrauterinog perioda još nisu potpuno poznati, ali izgleda da se početni deo odvija bez uticaja hormona, dok se kasnija faza razvija odvija pod uticajem hormona. Mlečna žlezda mladih životinja do puberteta pokazuje neznatnu aktivnost. Sa polnom zrelošću razvija se mlečna žlezda pod uticajem hormona ovarijalnog ciklusa: estrogena i progesterona, što dovodi do strukturnih promena u smislu izdužavanja i rasprostiranja primarnih mlečnih kanala (Cowie, 1980). U graviditetu počinje buran razvoj mlečne žlezde u organ za laktaciju. Kod goveda, već u četvrtom mesecu graviditeta počinje razvoj alveolarnog sistema. Razvoj kanalikularnog sistema zavisi od estrogena, a za razvoj parenhima potreban je progesteron. U evoluciji mlečne žlezde,

primarna i vodeća uloga ipak pripada hipofizi, jer njeno otklanjanje inhibira stimulatívno dejstvo estrogena i progesterona. Prema za sada poznatim činjenicama, prolaktin ima najjači mamogeni efekat koji je potpomognut delovanjem somatotropina, hormona rasta koji je samostalno neaktivan (Stojić, 1999). Zbog toga što čovek veštački produžava laktaciju kod krava preko fizioloških granica, samo vime ima malo vremena da se potpuno obnovi i pripremi za novi laktacioni period. Utvrđeno je da je za razvoj potpune funkcionalnosti mlečne žlezde dovoljno 6 nedelja. Najjači “mehanički efekat” na mlečnu žlezdu ima oksitocin, koji izaziva kontrakcije mioepitela oko mlečnih kanalića i dovodi do spuštanja mleka. Preduslov za aktivniju ejakciju mleka su pretežno opšte mehaničke i termičke draži papila ili sisa. Nadražaj za aktivnu ejakciju mleka javlja se aktom sisanja ili muže, i on se dalje prenosi preko srednjeg *Lemiskus*-a i *nucleus supraopticus*-a u hipotalamus, a zatim do hipofize. U neurohipofizi se izlučuje oksitocin, koji se stvara u ovim nukleusima međumozga, a akumuliran je u zadnjem režnju hipofize. Delovanje oksitocina traje vrlo kratko, od 6 do 8 minuta (Marković, 1980).

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 anatomske 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, laktoferin, komplement - nazvani jednim imenom laktenini 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 koža vimena;
2. fizičko-hemijska zaštita, koju čini keratin sa svojim antibaktericidnim 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 prodor 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 eksploataciju 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 snažan 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 naelektrisan, vezuje za negativno naelektrisan 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 laktenini. Naziv laktenini 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 humoralnog 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 cepa 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 stafilokoke, 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 zaštiti mlečnu žlezdu od infekcije koliformnim mikroorganizmima, posebno u fazi involucije, aktivacijom fagocitoze i sistema komplementa. Pored bakteriostatskog dejstva, laktoferin ima sposobnost da zaštiti 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 laktoferina. Aktivnost laktoferina 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 laktoferina počinje da raste 2-4 dana od prestanka muže i linearno se povećava u toku perioda zasušenja, kao posledica povećane neto sinteze laktoferina u periodu involucije vimena. Istraživanja Olivera i saradnika iz 2000. godine ukazuju da laktoferin može da deluje kao stimulator procesa fagocitoze bakterija i omogućava njihovo uklanjanje iz vimena.

U mleku se pored laktoferina 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 transcitoze. 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^-). U prisustvu egzogenog vodonik-peroksida, laktoperoksidaza može da oksiduje SCN^- do bakteriostatskih proizvoda, kao što je oksid jona tiocijanata (OSCN^-). Tiocijanat se nalazi u mleku, posebno kod krava koje sa hranom unose dosta leguminoza, dok se vodonik-peroksid može dobiti kako od 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. Mleko krava koje ima visoku

aktivnost ksantin oksidaze, deluje bakteriostatski na *E. coli*, nakon dodavanja nitrita (Hancock, 2002).

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 procesa involucije broj somatskih ćelija se povećava i do 1.000.000 ćelija/ml, verovatno kao posledica prestanka muže, da bi se pred sam partus broj ćelija ponovo smanjio na normalne vrednosti (Seiff, 1932; Schalm, 1971; Nickerson, 1989). 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 epitela vimena (Lee, 1980). U mleku se mogu naći najčešće tri različite kategorije ćelija. Polimorfonuklearni leukociti - neutrofilni granulociti su najčešće ćelije koje se mogu naći u mleku, sa jedrima od 2 do 5 segmenata. Veličina im varira od 9 do 15 µm. Mleko najviše sadrži neutrofilnih granulocita, a zatim eozinofilnih i najmanje bazofilnih granulocita (Miljković, 1992). Monociti bez lipidnih inkluzija se karakterišu promenljivim i nejasnim oblikom nukleusa sa difuznim hromatinom. Citoplazma ovih ćelija može biti i nekoliko puta veća od jedra, a veličina im se kreće od 8 do 18 µm. Monocita sa lipidnim inkluzijama ima dve vrste. Jedna vrsta ćelija su tipične masne ćelije mleka sa karakterističnom membranom oko fagocitnih vakuola. Druga vrsta ćelija slična je prvoj, samo bez karakteristične membrane i manje je prisutna u mleku od prve vrste ćelija. Limfociti su karakteristični po krupnom jedru i sa veoma malo prisutne citoplazme.

Epitelne ćelije potiču iz 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 zapaljensku 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. Ispitivanja broja B-limfocita pokazuje da on varira od 2 do 20% od ukupog broja ćelija u mleku, dok monociti u mleku ne prelaze 20% (Park i sar., 1992). Nosioци humoralne imunološke reakcije su B-limfociti. Imunološki zreli B-limfociti sintetišu se u hematopoetičnim ogranima, poseduju receptore koji su po prirodi imunoglobulini, i oni se nalaze u membrani. Najpre se pojavljuju B-limfociti sa receptorima koji nose IgM, zatim IgG i na kraju B-limfociti sa receptorima IgA (Mihajlović, 1983). T-limfociti su nosioци ćelijske imunološke reakcije i njihovo sazrevanje se vrši u timusu. Prema funkciji T-limfocita možemo razlikovati nekoliko subpopulacija, koje se dele na efektorske i regulatorske. Najzastupljeniji u populaciji T-limfocita su citotoksični CD8⁺, tako da odnos CD8 i CD4 ne prelazi 1% (Park i sar., 1992). Najveći deo efektorskih ćelija specifične odbrane organizma u epitelu mlečne žlezde su T-limfociti. Oni nose na sebi posebnu vrstu TCR markera koji su $\gamma\delta$ konfiguracije, a ekspresija posebnog gena (V γ 7) ukazuje da bi ovi intraepitelni limfociti mogli da budu nezavisni od timusa. Oni mogu da regulišu sintezu IgA od strane B limfocita, izlučuju citokine, a imaju svojstva NK (*natural killer*) ćelija (Tizard, 1996).

Većina imunoglobulina mleka potiče iz seruma, dok se sekretorni IgA i IgM sintetišu u samoj mlečnoj žlezdi i prelaze u mleko zajedno sa IgG antitelima.

Imunoglobulini G su funkcionalno monomeri, imaju molekulsku masu od 150.000 D i konstantu sedimentacije 7S. Ova populacija imunoglobulina sintetise se u organizmu pri kraju imunološkog odgovora, a maksimalna sinteza se odigrava u toku sekundarne imunološke reakcije. Molekuli IgG imaju sposobnost neutralizacije bakterijskih toksina, virusa, učestvuju u fagocitozi, opsonini aktivišu komplement i nastaje citoliza. Potklasa IgG₁ kod goveda, ovaca i koza aktiviše komplement i prelazi iz krvi u kolostrum, što nije slučaj sa potklasom IgG₂. Imunoglobulini M su makromolekuli sastavljeni od 5 monomera, koji su povezani sa malim peptidnim lancem, tzv. J lanac. Molekulska masa IgM iznosi oko 900.000 D, a konstanta sedimentacije iznosi 19S. Imunoglobulini M uspešno vezuju komplement, pa stoga dosta efikasno izazivaju citolizu. To su antitela koja se sintetisu u toku primarnog imunološkog odgovora i poluživot im je kratak. Sintetisani IgM u epitelnim ćelijama mukoze vezuju se za protein-sekretornu komponentu i putem fagocitoze se izbacuju na površinu sluzokože, gde zajedno sa IgA štite sluzokožu od prodora i delovanja patogenih mikroorganizama. Imunoglobulin A se u telesnim tečnostima pojavljuje kao monomer, dimer i trimer. Molekulska masa monomera je slična kao kod IgG i ima istu sedimentacionu konstantu. Do polimerizacije u dimere i trimere dolazi u epitelnim ćelijama sluzokože, u kojima se nastali polimer stabilizuje sekretornom komponentom (SC), sintetisanom u epitelnoj ćeliji. Imunoglobulini klase A nemaju mogućnost aktivacije komplementa klasičnim putem, ali je utvrđeno da u zajednici sa lizozimom mogu aktivisati komplement alternativnim putem preko C₃ komponente (Stojić, 1999).

Koncentracija antitela u normalnom mleku je niska (1-2mg/ml) i zavisi od vaskularne propustljivosti barijere krv-mleko. Kada je ova barijera narušena tokom zapaljenske reakcije, koncentracija antitela dostiže 50-80 mg/ml u kolostrumu i sekretu inficiranog vimena (Stojić, 2001). Imunoglobulini IgG₁ potklase potiču iz seruma i njihova koncentracija u mleku je oko 0,4 mg/ml, dok se potklasa imunoglobulina IgG₂ selektivno propušta u mleko i ima je u mnogo manjoj količini (0,03 mg/ml). Koncentracija IgA u mleku iznosi oko 0,15 mg/ml, a koncentracija IgM je mnogo manja i iznosi oko 0,05 mg/ml. Glavna funkcija antitela je opsonizacija mikroorganizama, kako bi bili lakše fagocitovani. U mlečnoj žlezdi se sintetise IgA u maloj količini, a ima ulogu u sprečavanju adhezije mikroorganizama za površinu epitela. Smatra se da je

mala koncentracija IgA u mlečnoj žlezdi jedan od uzroka uspešne adherencije stafilokoka za epitel kanala mlečne žlezde (Bojanić, 2000).

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. Mastitis predstavlja veliki zdravstveni i ekonomski problem u zapaštima visokomlečnih krava. Danas se mastitis definiše kao odgovor mlečne žlezde na prisustvo mikroorganizama. Odgovor može da bude izražen u kliničkoj formi (klinički mastitis), sa raširenošću od 1-3%, i u subkliničkoj formi (subklinički mastitis), sa raširenošću više od 30% (Stojanović, 2001).

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, kada 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 (Bramley, 1991). U slučajevima subkliničkih mastitisa ne zapažaju se klinički vidljive promene na mlečnoj žlezdi, već samo u mleku. Na taj način, za otkrivanje subkliničkih mastitisa koriste se metode zasnovane na merenju promena u mleku, a to su najčešće metode koje određuju broj leukocita u mleku (Klastrup, 1985; Sandholm, 1986; Sender, 1986). Povećan broj leukocita je znak reakcije tkiva, pa su i promene u mleku rezultat promena u tkivu (Katić, 1998; Shepers, 1997). Kliničke forme mastitisa lako se zapažaju, dok su subklinički mastitisi, koji višestruko negativno deluju, praktično nevidljivi.

Kako četvrti vimena međusobno ne mogu da komuniciraju, uzročnici pri spontanom pojavljivanju mastitisa mogu da dospeju u mlečnu žlezdu na nekoliko načina:

1. putem krvotoka iz nekog žarišta u organizmu (hematogeno, limfogeno);
2. kroz sisni otvor i sisni kanal (galaktogeno);
3. preko povreda na koži sisa i vimena (infekcija rane).

Mastitisi se po toku mogu podeliti na perakutne, akutne, subakutne i hronične. Na osnovu kliničko-patološke slike toka oboljenja, mastitisi se mogu podeliti na

kataralne (zapaljenjem zahvaćen sisni kanal i cisterna), intersticijalne (zahvaćeno vezivno tkivo mlečne žlezde) i parenhimatozne (mastitisom zahvaćen žlezdani deo vimena).

Mastitisi se mogu još podeliti i u zavisnosti od mikroorganizama koji izazivaju zapaljenski proces i koji se nalaze u mleku, odnosno na osnovu izazivača mastitisa tj. etiologije.

Etiološka podela mastitisa:

1. **Specifični:**

Specifično patogeni:

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

Uslovno saprofitski:

- *Corynebacterium bovis;*
- Nehemolitične mikrokoke.

2. **Nespecifični:**

- Aktinomikoza, botriomikoza, tuberkuloza, *Listeria sp, Leptospira sp., Pneumococcus sp., Brucella sp., Candida albicans, Criptococcus neoformans*, mikoplazme, alge - *Prothoteca sp.,* rikecije.

Postoji i nekoliko sledećih podela uzročnika mastitisa (Pankey, 1989; Radostits, 1994; Stojanović, 2001):

1. **Patogeni mikroorganizmi:**

- *Staphylococcus aureus;*
- *Streptococcus agalactiae;*
- *Arcanobacter pyogenes;*
- *Pseudomonas aeruginosa;*
- *Mycoplasma.*

Mikroorganizmi okruženja:

- *E. coli*;
- *Proteus sp.*;
- *Klebsiella sp.*;
- *Streptococcus uberis*;
- *Streptococcus dysgalactiae*.

Normalna mikroflora izvodnog mlečnog kanala:

- *Staphylococcus hycus*;
- *Staphylococcus epidermidis*;
- Koagulaza negativne stafilokoke (CNS);
- *Corynebacterium bovis*.

2. Uzročnici velike patogenosti (major pathogens):

- *Staphylococcus aureus*;
- *Streptococcus agalactiae*;
- *Mycoplasma*;
- *E. coli* - koliformni mikroorganizmi.

3. Uzročnici male patogenosti (minor pathogens):

- *Corynebacterium bovis*;
- Koagulaza negativne stafilokoke (CNS).

Kako se u literaturi sreću različite podele mastitisa, radi lakšeg objašnjavanja problema treba se zadržati na kliničkoj podeli, koja je zasnovana na toku bolesti, osobinama sekreta, kao i vrsti simptoma koji preovladavaju u kliničkoj slici.

Imajući u vidu značaj mastitisa, kako sa gledišta zdravlja životinja, tako i sa ekonomskog aspekta govedarske proizvodnje, Zakon o veterinarstvu (Sl. glasnik RS 91/05, 30/10, 93/12) je u delu zaraznih bolesti životinja određenih Zoosanitarnim kodeksom (OIE) uvrstio oboljenje - Enzootski mastitis goveda. Takođe, Program mera zdravstvene zaštite životinja u Republici Srbiji (Sl. glasnik RS 21/12) obavezuje veterinarsku službu Republike Srbije da prati, otkriva, suzbija i kontroliše infektivno zapaljenje mlečne žlezde, izazvano stafilokokom ili streptokokom.

Akutni kataralni mastitisi (*mastitis catarrhalis acuta*) ređe su praćeni poremećajem opšteg stanja. Sekretija mleka je smanjena, a mleko može da sadrži primese gnoja. Epitel sluzokože cisterne je zadebljao, delimično deskvamisan i infiltrovan seroznom tečnošću koja je bogata belančevinama, limfocitima i histiocitima. Sise su bolne i životinja se opire muži. Najčešći prouzrokovaci ovog mastitisa su streptokoke (*Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* i *Streptococcus uberis*), ređe drugi mikroorganizmi. Javlja se neposredno posle telenja, 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 (Miljković, 1982). Mleko može da sadrži deskvamisan epitel izvodnih kanala u obliku krpica, kao i primese krvi. Ovi mikroorganizmi tokom vremena dovode do prestanka sinteze mleka, odnosno do agalaksije, što je poznato kao zarazno presušenje vimena ili žuti galt. Radovi Keefe-a iz 1977. godine pokazuju da *Str. agalactiae* može biti prisutan na farmama u visokom procentu, čak i do 44,7%. Isti autor navodi da od 58,5% inficiranih krava, čak 69% izolata je činio *Str. agalactiae*. Keskin (2007) u svom radu navodi da je *Streptococcus sp.* bio prisutan kod 12,3% mlečnih krava, CNS kod 10,9%, *S. uberis* kod 9%, a *S. aureus* kod 34,7% mlečnih krava. Akutne mastitise u mnogo blažoj formi izaziva *Str. dysgalactiae*, ali se sisanjem teleta ovi mastitisi veoma lako prenose iz jedne u drugu četvrt. Ovaj mastitis na farmama može biti prisutan u subkliničkom obliku i može da čini od 7%--75% ukupnih mastitisa (Schalm, 1971). Prisustvo ove bakterije nađeno je u ranama na sisama (61% - 81%), a može da preživi niske i visoke temperature i po nekoliko nedelja na raznim štalskim alatkama i mašinama (Schalm, 1971). Kao rezervoar streptokoka može biti koža krave, gde ovaj mikroorganizam može da preživi od 1 do 26 dana (Schalm, 1971).

Hronični kataralni mastitisi (*mastitis catarrhalis chronica*) prolazi najčešće nezapaženo i veoma često prouzrokuje zadebljanja tkiva. Makroskopski, sekretija uglavnom nije promenjena, ali mleko sadrži povećan broj somatskih ćelija i ima specifičan ukus soli. Smanjuje se sekretija mleka, a može i sasvim da prestane. Kod hroničnih kataralnih mastitisa veoma često se stvaraju intralobularne ciste, koje se palpiraju kao čvrsti čvorići, ponekad pokretni, odmah ispod kože. Zbog dugog trajanja procesa kod hroničnih kataralnih mastitisa, mogu se formirati i pseudokonkrementi (*corpora amylacea*) u mleku. Najčešće se hronični kataralni mastitisi ne mogu klinički

uočiti, pa prolaze kao latentne ili subkliničke infekcije. Izazivači hroničnog mastitisa pretežno su mikroorganizmi iz roda *Streptococcus*, ređe *Staphylococcus*, *Micrococcus* i *Pseudomonas*.

Stafilokoke mogu u akutnoj formi da izazovu teške, maligne mastitise, u vidu granulomatoznih promena. Koža je cijanotična, zažarena, a u parenhimu se javljaju nekrotična žarišta. Krvni sudovi u akutnoj formi stafilokoknog mastitisa često tromboziraju. Javlja se visoka temperatura 41-42°C, ubrzan puls, gubitak apetita, prestanak preživljanja, a zahvaćena četvrt je tvrda, bolna i zacrvenjena. Tokom 24h može da dođe do gangrenoznog zapaljenja vimena, koje postaje modro i tamno. Ovaj stadijum bolesti često prati toksemija. Mleko je promenjene boje i veoma često sadrži krvne ugruške. Hronične forme stafilokoknog mastitisa uglavnom često prolaze i kao subklinički oblici oboljenja mlečne žlezde. Zahvaćene četvrti obično prati vezivno-tkivna induracija žlezdanih acinusa, kao i atrofija četvrti sa polipoznim zadebljanjima sluzokože cisterne. Mleko uglavnom nije promenjeno, a produkcija je smanjena. Middleton (2008) u svojim istraživanjima navodi da je *S. aureus* prisutan kod 7% krava na farmama, a koagulaza negativne stafilokoke (CNS) čak kod 58% krava. Klinički mastitisi izazvani *S. aureus*-om prisutni su na nekim farmama i do 18,7% (Keskin, 2007). Leitner (2011) navodi da CNS mogu biti prisutne u vimenu mlečnih krava i preko 25%, a *S. aureus* od 3% - 7% od ukupnih mastitisa na jednoj farmi. Interesantan je rad Roesch-a (2007) koji je upoređivao organsku proizvodnju mleka i klasičan sistem držanja mlečnih krava i nije našao statističku značajnost u procentu pojavljivanja najčešćih uzročnika mastitisa. Subklinički mastitisi izazvani *S. aureus*-om na farmama mogu biti prisutni od 20% do 28%, koagulaza negativnim stafilokokama od 18% do 28%, *E. coli* do 1%, *C. bovis* oko 5%, dok *S. agalactiae* nije bio izolovan (Roesch, 2007). Radovi Vakanjac i saradnika (2008) opisuju subkliničke mastitise izazvane *S. aureus*-om prisutnih u mleku kod 19% do 33,3% krava, a kliničke mastitise izazvane istim mikroorganizmom kod 14,2% grla.

Akutni kataralni mastitis može izazvati i mikroorganizam iz roda *Pseudomonas spp.* (*P. aeruginosa*) sa pojavom krpica gnoja u mleku i induracijom četvrti. Ponekad, pseudomonas može da izazove teške akutne mastitise, koji ugrožavaju život životinji, zbog pojave hiperemije i nekroze tkiva. Limfni čvorovi u tom slučaju su uvek povećani i bolni.

Piogeni mastitisi (*mastitis apostematosa*) najčešće su izazvani bakterijom *Arcanobacter pyogenes*, ređe drugim mikroorganizmima, kao što je *Spherophorus necrophorus*. Smatra se da infekcija nastaje nakon povreda sisa ili vimena, koje su nastale kao posledica ujeda insekata na paši. Predisponirajući faktori za nastanak ovog mastitisa su povrede sisa i kože same mlečne žlezde, prouzrokovane hroničnim bakterijskim infekcijama, pašom u blizini močvare, kao i lošim vremenskim prilikama. Oboljenje se javlja najčešće leti, dok su životinje na paši i usled povećanog broja insekata. Na vimenu se uočavaju čvrste tvorevine, različite veličine i broja, koje se mogu lako palpirati. Limfni čvorovi su najčešće povećani, ali opšte stanje životinje ne mora biti promenjeno. Moguće je spontano otvaranje apcesa iz koga se cedi gnojno-nekrotična masa. Zbog specifičnosti mikroorganizma moguće su metastaze na jetri, bubrezima, tetivama i zglobovima.

Flegmonozni mastitis (*mastitis phlegmonosa*), još se naziva i “koli” mastitis, zbog činjenice da je najčešći prouzrokovatelj ovog mastitisa *Escherichia coli*, a ređe drugi koliformni mikroorganizmi, kao što su *Proteus* ili *Klebsiella*. Predisponirajući faktori su porođaj, zadržana posteljica, neispravni i nečisti aparati za mužu i visoka mlečnost. Ovi uzročnici su normalni stanovnici okolne sredine, digestivnog trakta, kože i spadaju u ubikvitarne bakterije, a postaju patogeni kada se naruši odnos mikro i makroorganizma. Klinički koliformni mastitisi nastaju obično u laktaciji, a retko u zasušenju. Perakutni koliformni mastitis je teško oboljenje koje se javlja naglo sa izraženom toksemijom, gubitkom apetita, depresijom, groznicom i povišenom telesnom temperaturom, od 40-42°C. Životinje najčešće leže, rad srca je ubrzan i prisutna je indigestija. Obolele četvrti su tople, bolne, jače ili slabije otečene, a menja se i izgled mleka, od vodenastog sekreta, do retke žučkaste tečnosti (boje piva) sa pahuljicama. Ovaj mastitis je prisutan na farmi i do 3% od ukupnih mastitisa (Keskin, 2007). Ponekad mogu da se jave pareze ili paralize zadnjeg dela tela. Tok perakutnog mastitisa je brz, tako da kod nekih životinja može da dođe i do letalnog ishoda u toku 24-48 sati od pojave prvih simptoma. Akutni i hronični tok ovog mastitisa protiče sa mnogo blažim simptomima, jer je otok vimena manji, a telesna temperatura nije povećana. Mleko je promenjeno, kao i u perakutnom toku.

Granulomatozni mastitis (*mastitis granulomatosa*), odnosno gljivični mastitisi, se javljaju veoma retko, obično posle dugotrajne terapije antibioticima ili

kortikosteroidima. Uzročnici su uglavnom iz roda *Candida* ili *Criptococcus*. Mastitisi se manifestuju uvećanjem četvrti vimena, koje postaju tvrde konzistencije, kao i pojavom sluzavog, sivo-belog, rastegljivog sekreta u mleku. Količina mleka može biti smanjena.

2.4. Profilaksa i terapija mastitisa

2.4.1. 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 prodor 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 zapaćtima 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 ujeća 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 jodofornih, 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 10 minuta, ali taj način dezinfekcije usporava mužu, a sisne čaure brže propadaju, što dovodi do veće mogućnosti infekcije. Povratno ispiranje vodom pri temperaturi od 85°C 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 kompletnu 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 izleči oko 80% krava obolelih od mastitisa izazvanog *Staphylococcus aureus*-om, u odnosu na oko 40% izlečenja u laktaciji. Čak do 90% streptokoknih mastitisa se izleči u ovom periodu, u odnosu na 70% izlečenja u laktaciji (Boboš, 2001).

2.4.2. 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 prouzrokovaci 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 indicirano 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 indicirano je davanje antibiotika širokog spektra (cefalosporini 3-5 g, sulfonamidi 50 g intravenski i sl.), a parenteralna terapija traje dok je životinja febrilna. Obolelu 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 indicirano 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, Clotimazol) 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.

2.4.3. Morfološke i biohemijske osobine *Staphylococcus aureus*

Robert Koch je 1878. godine prvi ustanovio stafilokoke u preparatima gnojnih rana. Dve godine kasnije, 1880. godine, Paster je uspeo da kultiviše stafilokoke u bujonu. Oston je u isto vreme (1881. godine) iz patološkog materijala poreklom od zamoraca i mačaka, takođe uspeo da kultiviše stafilokoke. Stafilokoke su dobile ime od grčke reči *staphylos* što znači grozd i *coccus* što označava zrno. Stafilokoke nalazimo na koži i sluzokoži ljudi i životinja. Mogu da budu patogene, kada dovode do gnojnih procesa. Uzrokuju pojavu furunkula, karbunkula, osteomijelitisa, pneumoniju i dr. Dovode do pojave gnojnog zapaljenja vimena kod goveda i ovaca. Neki sojevi proizvode jak toksin (enterotoksin), koji kod ljudi dovodi do alimentarnih intoksikacija.

Morfološke osobine. *Staphylococcus aureus* je gram pozitivna nepokretna bakterija, okruglog je oblika, veličine 0,8 - 1,0 mikrometra. U mikroskopskom preparatu se uočavaju u vidu grupica, nepravilnog oblika koji podsećaju na grozdove, a neki sojevi poseduju i kapsulu.

Kulturelne osobine. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) se dobro razmnožava na čvrstim hranljivim podlogama i obrazuje pravilne, okrugle kolonije, blago ispupčene. Pored pravilnih S formi, mogu se zapaziti i R i G kolonije. Kolonije su pigmentisane u većini slučajeva zlatnožutim pigmentom, ali neki sojevi mogu da poseduju i beli pigment (Marković, 1990; Quinn, 2002). Kolonije su veličine 3-5 mm sa jasnom zonom hemolize. Hemolizu izaziva alfa hemolizin, koji izaziva pojavu sasvim prosvetljene zone (potpuna hemoliza) oko kolonije širine oko 2 mm ili beta hemolizin, koji uzrokuje

zonu nepotpune hemolize. *S. aureus* poseduje metabolizam respiratornog i fermentativnog tipa. Razlaže glukozu, laktozu, maltozu i manit, eskulin, a skrob ne hidrolizuje. Nitrate redukuje do nitrita. Proizvodi fermente kao što su proteaza, lipaza, fosfataza i esteraza. Najveći broj sojeva stvara koagulazu. Mada je izgled kolonija i zona duple hemolize dosta karakteristična za *S. aureus*, za pouzdanu identifikaciju treba uraditi i neka dopunska ispitivanja. Najpouzdaniji dokaz je koagulaza test (Marković, 1990; Quinn, 2002; Steele, 1979).

S. aureus stvara alfa, beta i delta hemolizin. Alfa i beta hemolizin luče patogeni sojevi stafilokoka. Alfa toksin je protein bez ugljenohidratnog dodatka. Molekulska masa ovog toksina je 28.000 do 39.000 D, a sedimentacioni koeficijent 3S. Ovaj toksin ima hemolitično, citotoksično, dermonekrotično i letalno dejstvo. Alfa toksin je letalan za hladnokrvne životinje, kao što su žabe, pastrmke i sl., ali je letalan i za ljude i toplokrvne životinje. Oštećuje nervni sistem, glatku muskulaturu, izaziva nekrozu kože i inhibira migraciju neutrofila i monocita. Alfa toksin ispoljava "Arrhenius efekat", što znači da se inaktivise na 60°C i ponovo dobija deo aktivnosti zagrevanjem na 100°C. Alfa hemolizin igra značajnu ulogu u razvoju gangrenoznog mastitisa kod ovaca i kunića. Beta hemolizin je protein molekulske mase 26.000 do 38.000 D. Beta hemolizin specifično razlaže sfingomijelin u ćelijskoj membrani, a najosetljiviji su eritrociti ovce, koze i goveda, jer njihova membrana sadrži i do 50% sfingomijelina. Beta toksin ne lizira ćelije, ali ih čini osetljivijim na dejstvo drugih litičnih agenasa, predstavlja toplo-hladni hemolizin, jer ima osobinu da izaziva slabo vidljivi efekat na krvne ćelije kada se inkubiraju na 37°C, dok kompletna hemoliza nastaje posle držanja na temperaturi od 0 do 4°C. Inhibira migraciju monocita, ali ne i neutrofila. Leukocidin je proizvod *S. aureus*, pomoću koga se mikroorganizam brani od fagocitoze. Sojevi *S. aureus* koji sintetišu leukocidin jako inhibiraju neutrofile, ali i monocite.

Optimalna temperatura za razmnožavanje *S. aureus* je 30-37°C. Mogu se razmnožavati između 6-46°C i veoma dobro podnose promene pH koncentracije (od 4,2 do 9,3). Optimalna pH koncentracija je 7-7,5. Uzročnik se može razmnožavati i u rastvoru sa 15% NaCl i 40% žuči (Marković, 1990; Quinn, 2002).

Antigena građa. Antigene osobine stafilokoka uslovljene su građom ćelijskog omotača koji u sebi sadrži složeni peptidoglukan kao deo spoljašnjeg zida i kompleks mukopolisaharida-tejhonske kiseline, koji ulazi u sastav jedinice unutrašnjeg zida. Ovi

antigeni su slabi imunogeni, a bolji imunogen je egzopolisaharid kapsule (polisaharidni molekul), koji se nalazi kod svega 3% populacije stafilokoka. Egzopolisaharid kapsule je značajan faktor virulencije ovog mikroorganizma, zato što inhibira prepoznavanje antitela vezanih za visoko antigeni ćelijski zid od strane neutrofila. Velika smetnja u stvaranju uspešne vakcine protiv *S. aureus* je ekstracelularni polisaharid koji mikroorganizmi formiraju kada uđu u mlečnu žlezdu. Kapsula dopušta da komplemet i antitela penetriraju, ali maskira prepoznavanje mikroorganizma od strane polimorfonukleara, kao i sprečavanje aktivacije komplemeta. Polisaharidi su slabi imunogeni, ali stvorena antitela su efektni opsonini za polimorfonukleare kod ljudi i životinja. U 94%, pa čak i do 100% sveže izolovanih sojeva *S. aureus* iz mleka krava sa mastitisom su inkapsulirani sojevi, ali je kapsula slabo ispoljena kada se kultivišu *in vitro* (Guidry, 1994). Ispitivanja mnogih istraživača idu u pravcu otkrivanja najboljeg antigena ćelijskog zida i do sada su izdvojeni protein A i fibronektin vezujući protein (*fibronectin-binding protein*), koji bi mogli biti dobri imunogeni (Nordhaug, 1994). Protein A ima imunološku aktivnost i igra ulogu mitogena za T limfocite.

Adherencija stafilokoka na ćelije mlečne žlezde. Finaly (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. Mikroorganizmi su stvorili više mogućnosti za interakciju sa ovim komponentama. Prema ovom autoru, mikroorganizmi često uspevaju da izbegnu imunološki sistem domaćina zahvaljujući izlučenim produktima domaćina, koji mogu poslužiti kao most za njihovu adherenciju za ćelijske receptore, vezujući se za njih. Vezivanje mikroorganizama za ekstracelularne proteine matriksa omogućuje stabilne uslove za proliferaciju. *S. aureus* sadrži nekoliko površinskih proteina koji se vezuju za proteine plazme domaćina i pomažu adherenciju bakterija za ćelije ili tkiva. 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 za epitelne ćelije i masne kapljice mleka (Bojanić, 2000; Foster, 1991). Ustanovljeno je da antitela iz mleka i seruma inhibiraju adherenciju *S. aureus* (Olmstead i Nercross, 1992). Adherencija *S. aureus* za ćelije mlečne žlezde i njihovo oštećenje se povećava, idući od ćelija sisnog kanala, prema ćelijama mlečnih kanala i sekretornim ćelijama. Egzopolisaharidi kapsule sprečavaju adherenciju *S.*

aureus za epitelne ćelije mlečne žlezde i kolagen. Mikroorganizmi sa čvrstom kapsulom se adheriraju u manjem stepenu nego mikroorganizmi sa mekom kapsulom. *S. aureus* adherira mnogo bolje za kolagen nego za zdravi monosloj ćelija oštećenih alfa toksinom (Bojanić, 2000.). U ranom stadijumu infekcije, adherencija za epitelne ćelije štiti *S. aureus* od ispiranja tokom muže. *S. aureus* se vezuje za proteine membrane masnih kapljica kravljeg mleka i epitelne ćelije mlečne žlezde pomoću proteina ćelijskog zida, što mu omogućava održavanje i širenje u mlečnoj žlezdi (Bojanić, 2000; Sutra, 1994; Poultrrel, 1994). Adherencija *S. aureus* za epitelne ćelije mlečne žlezde se povećava produžavanjem vremena inkubacije od 30 do 120 minuta. Adherencija je veća pri 37°C nego pri 22°C, kao i u kiselom pH 5,9, u odnosu na pH 7,2 (Bojanić, 2000). Ustanovljeno je da je adherencija *S. aureus* mnogo veća za sveže epitelne ćelije mlečne žlezde krava, nego za ćelije u kulturi (Opdebeeck, 1988).

Izolovanje i identifikovanje *S.aureus*. Ovaj patogeni mikroorganizam ne zahteva specifične podloge za rast. Raste na krvnom agaru sa dodatkom 5-10% krvi. Mada su izgled kolonija i zona duple hemolize dosta karakteristični za *S. aureus*, za pouzdanu identifikaciju treba uraditi i neka dopunska ispitivanja. U tu svrhu koriste se najčešće specifične podloge, kao što su Baird-Parker-ova ili Chapman-ova podloga. Na Baird-Parker-ovoj podlozi koagulaza pozitivne stafilokoke rastu u vidu sjajnih kolonija sa sivkastim rubom i zonom prosvetljenja (slika 2). Na agaru po Chapman-u, patogene stafilokoke rastu u obliku žutih kolonija. Žuta boja nastaje usled razlaganja manita i promene indikatora (fenolcrveno) iz crvene u žutu boju.



Slika 2. Izgled kolonija *Staphylococcus aureus* na krvnom agaru
(www.bacteriologieatlas.de/Bakterien/staphylococcus_aureus.htm)

2.4.4. Morfološke i biohemijske osobine *Streptococcus agalactiae*

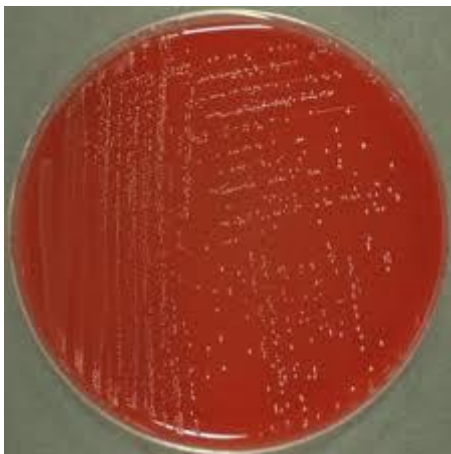
Rod *Streptococcus* pripada porodici *Lactobacillaceae*, i obuhvata veliki broj vrsta koje ispoljavaju značajne ekološke, fiziološke, antigenske i genetske razlike. Kako taksonomija nije definitivno ustanovljena u upotrebi je veći broj podela i klasifikacija ovog roda. Najstarija podela se zasniva na pojavi i izgledu hemolize na krvnom agaru, a streptokoke su svrstane u alfa (α), beta (β) i gama (γ) hemolitičke grupe. Na osnovu antigenih karakteristika ćelijskog zida (karbohidratne komponente C), Rebeca Lancefield ih je podelila u 21 serološku grupu, koje su označene velikim slovima abecede. Treća podela se zasniva na ekološkim, fiziološko-biohemijskim osobinama i osobinama patogenosti, pa su streptokoke podeljene u piogene, mlečno-kiselinske, viridans-zelene i enterokoke.

Streptococcus agalactiae je gram pozitivna koka, koja pripada serološkoj grupi B, daje alfa (α), beta (β) i gama (γ) hemolizu na podlozi koja sadrži krv ovce. Prvi radovi o ovom mikroorganizmu ukazuju na njegovu patogenost za krave, koze i ovce, gde izaziva akutne i hronične mastitise. U poslednjih trideset godina istraživanja ovog mikroorganizma, *Streptococcus agalactiae* predstavlja veoma važan i patogen uzročnik bolesti ljudi i novorođenčadi u neonatalnom periodu, izazivajući septikemije, pneumonije i meningitise. Razlog zašto se pridaje važnost *Streptococcus agalactiae* jeste još uvek nerazjašnjena mogućnost linearnog prenošenja sa obolele krave na ljude (Bisharat, 2004). *Streptococcus agalactiae* važan je uzročnik infekcija žena tokom porođaja, i ozbiljnih obolenja odraslih ljudi obolelih od hroničnih bolesti, kao što su dijabetes melitus i maligna stanja (Farley, 2001). *Streptococcus agalactiae* je izolovan u 15-40% u vaginalnoj i rektalnoj flori žena, a bebe, čije majke imaju u vaginalnoj flori ovaj mikroorganizam, mogu da obole od neonatalnih infekcija i pre porođaja (Edwards, 2001).

Morfološke osobine. *Streptococcus agalactiae* je gram pozitivna nepokretna bakterija, okruglog oblika, veličine 0,6 - 1,2 mikrometra. U mikroskopskom preparatu se uočavaju u vidu dugih ili kratkih lanaca.

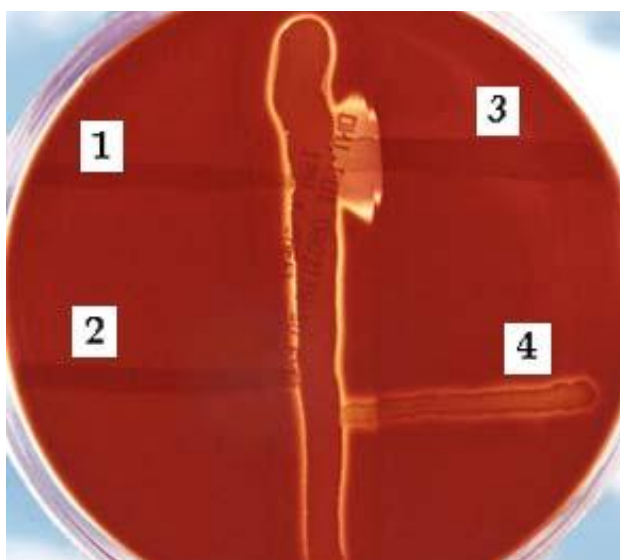
Kulturelne osobine. *Streptococcus agalactiae* u bujonu raste u obliku lanca različite dužine, pri čemu zamućuje podlogu bujona mukoidnim, pahuljastim talogom.

Na krvnom agaru obrazuje pojedinačne, sitne, providne kolonije sa alfa, beta i gama hemolizom (Slika 3).



Slika 3. Izgled kolonija *Streptococcus agalactiae* na krvnom agaru
(www.pictures.life.ku.dk/atlas/microatlas/veterinary/bacteria/Streptococcus_agalactiae)

Za dokazivanje *Str. agalactiae* koristi se Edwardsova podloga ili CAMP test. Osobina streptokoka grupe B jeste sposobnost da stvaraju faktor koji potencira hemolitično delovanje beta toksina *Staphylococcus aureus* i tako dovode do potpune hemolize eritrocita na krvnom agaru. Ta osobina *Str. agalactiae* se dokazuje CAMP testom (Slika 4), koji se u 90% slučajeva slaže sa serološkom determinacijom grupe.



Slika 4. CAMP test(www.jilindquist.net/generalmicro/dfhemo.html)

Antigena građa. Proteini površinskog dela *Streptococcus agalactiae* imaju značajnu ulogu u infekciji, kao i u pripremi vakcina. Sve veći je broj radova koji se bave determinacijom površinskih antigena *Streptococcus agalactiae*, njihovom adhezijom za epitelne ćelije, interakcijom mikroorganizma sa matriksom i plazma proteinima, kao i načinom izbegavanja imuniteta domaćina (Edwards, 2001; Brodeur, 2000; Larsson, 1999). Do sada je identifikovano devet različitih tipova polisaharida antigena kapsule (Kogan, 1996), tako da su svi izolovani sojevi *Streptococcus agalactiae* podeljeni u devet grupa. Prva četiri "klasična" tipa identifikovana po Lancefildovoj su Ia, Ib, II i III, i izazivaju neonatalne septikemije i meningitise (Lindahl, 2005). Tip Ia je često izolovan mikroorganizam u teškim invazivnim infekcijama, dok je tip III najčešći uzročnik ranih i kasnih neonatalnih infekcija (Lindahl, 2005). Mikroorganizmi tipa VI i VIII su izolovani kod zdravih žena u Japanu (Lachenauer, 1999). Prvi površinski protein antigen koji je izolovan bio je c antigen, koji determiniše celu bakterijsku ćeliju (još se obeležava kao Ibc) (Wilkinson, 1971). Karakteristika ovog antigena jeste što je sastavljen iz tripsin rezistentnog α proteina i tripsin senzitivnog β proteina (Lindahl, 2005). Do sada su identifikovana četiri člana α proteina (Alp) i to su: α , Rib, R28 i Alp2 (Lindahl, 2005). Tripsin senzitivni β proteina reaguje sa dve komponente imunološkog sistema, i to su: IgA-Fc i faktorom H (FH). Ovaj protein je otkriven u skoro svim ćelijama serotipa Ib, a nešto manje je zastupljen u serotipovima Ia, II i V, a skoro nikada u serotipu III (Suvorov, 1997). Iz, za sada nepoznatih razloga, ćelije koje pokazuju ekspresiju β proteina, uvek pokazuju i ekspresiju α proteina, za razliku od α proteina koji se često pojavljuje sam. Protein, koji se može identifikovati kod većine, ali ne kod svih tipova *Str. agalactiae*, jeste Lmb površinski lipoprotein. U početku je nosio naziv laminin-binding površinski protein, i smatra se da ima ulogu u naseljavanju i kolonizaciji mikroorganizma na oštećene epitele (Spellerberg, 1999). Literatura opisuje još nekoliko površinskih proteinskih antigena kao što su: Fibrinogen-Binding FbsA protein, Sip protein, kao i nekoliko površinski aktivnih enzima (C5a peptidaza-ScpB, proteaza-ScpA) (Harris, 2003). Koristeći antiserum protiv cele bakterijske ćelije, Wilkinson (1972) je zaključio da četiri R antigena (R1-R4) i X antigen, takođe pripadaju površinskim antigenima ćelije mikroorganizma.

2.5. Imunoprofilaksa mastitisa

Radovi iz oblasti vakcinisanja preživara protiv uzročnika mastitisa ukazuju na ograničen uspeh u dobijanju značajnijih rezultata imunoprofilakse. Još pre 80 godina je pokazano da subkutana injekcija žive kulture *Staphylococcus aureus* kod ovaca stvara znatnu otpornost na eksperimentalno izazvani stafilokokni mastitis. Ne tako davno je potvrđeno da žive *S. aureus* vakcine daju znatnu zaštitu protiv eksperimentalnih mastitisa ovaca, dok mrtve vakcine nisu efikasne (Watson, 1978). Imunoprofilaksa protiv mastitisa tokom sedamdesetih godina prošlog veka temeljena je na polivakcinama koje su u svom sastavu imale imunogene sojeve stafilokoka, streptokoka i koliformnih bakterija, egzotoksine i endotoksine (Teofanović, 1979). Polivalentne vakcine se nisu u praksi pokazale kao uspešne, pa je napušten taj sistem pripreme vakcina i otpočela je proizvodnja monovakcina, koje su dale mnogo bolje rezultate. Eksperimentalne vakcine protiv mastitisa su monovalentne i sadrže inaktivisane ćelije mikroorganizama *S. aureus*.

Veliki broj radova ukazuje da vakcina koja je pripremljena od inaktivisane bakterije smanjuje pojavu kliničkih i subkliničkih mastitisa. Preliminarni eksperimentalni uspeh postigla je vakcina protiv *Streptococcus uberis* bazirana na plazminogen aktivatoru, PauA (*total antigen*) i protein G agarozu (*depleted antigen*), što je znatno različit pristup u izradi vakcina u odnosu na druge, do tada, eksperimentalne ili komercijalne vakcine protiv mastitisa (Yancey, 1993). Stafilokoke i streptokoke su veoma slabi imunogeni, što dovodi do toga da efikasna vakcina protiv ovih mikroorganizama nije još uvek pronađena. Veoma dobar imunogen je *E. coli*, za razliku od prethodnih mikroorganizama, što olakšava i pojednostavljuje pripremu efikasne vakcine. Dobre rezultate u zaštiti od koliformnih mikroorganizama, postigla je vakcina po imenu J5, koja je proizvedena od tzv. Core-antigena (Cullor, 1991) ili J5 bakterina (Cullor, 1991; Hogan, 1995). U ovom trenutku je to jedina visoko efikasna vakcina, koja daje zaštitu, ne samo protiv različitih sojeva *E. coli*, već i protiv drugih koliformnih bakterija. Vakcina proizvedena od živih mikroorganizama *Mycoplasmae bovis* takođe je pokazala dobre rezultate, povećavajući nivo antitela u serumu (IgG, IgM), kao i smanjujući broj kliničkih i subkliničkih formi mastitisa izazvanih mikoplazmama (Boothby, 1987).

2.5.1. Imunoprofilaksa mastitisa izazvanih bakterijama *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus agalactiae*

Veliki broj radova u svetskoj literaturi posvećen je pripremi eksperimentalne vakcine protiv mastitisa izazvanog bakterijom *S. aureus*. *Staphylococcus aureus* je mikroorganizam koji izaziva teške akutne mastitise, veoma često sa promenom opšteg stanja, kao i subkliničke forme mastitisa. Terapija ovog mastitisa ne daje uvek zadovoljavajuće rezultate i to je još jedan razlog zbog kojeg se rešenje problema ovog mastitisa traži u kvalitetnoj vakcini. Stafiločke i streptokočke su veoma slabi antigeni, što dodatno onemogućava i otežava pronalazak 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.

Dizajn vakcine. Imunoprofilaksa protiv mastitisa tokom sedamdesetih i osamdesetih godina temeljena je na polivakcinama, koje su u svom sastavu imale imunogene sojeve stafiločke, streptokočke i koliformnih bakterija, egzotoksine i endotoksine. Iako je ovaj način pripreme polivakcina napušten, jer se vakcine u praksi nisu pokazale efikasnim, bilo je autora koji su pokušali da bivalentnim vakcinama postignu veću efikasnost. Bivalentne vakcine su sadržavale formalinom (0,4%) inaktivisane ćelije *S. aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae* i delove kapsule *S. aureus*. Svaka doza ove vakcine sadržavala je 1×10^{10} cfu/ml oslabljenog *S. aureus*, zatim 4×10^9 cfu/ml *Streptococcus spp.* i 5 mg SM kapsule, po dozi. Navedeni mikroorganizmi u ovoj bivalentnoj vakcini izolovani su na oglednoj farmi iz mleka krava sa kliničkim mastitisom (Giraud, 1997). Monovalentna vakcina protiv mastitisa izazvanog bakterijom *S. aureus* sadrži formalinom inaktivisani *S. aureus*, u količini od 1×10^{11} cfu/ml i alfa toksin 10 hemolitičnih jedinica (Han, 2000). U literaturi se može naći da vakcine sadrže samo formalinom (0,5%) inaktivisane bakterije dva soja *S. aureus*, i to jedan soj sa 1×10^{11} TBC (ukupnih bakterijskih tela) i drugi soj sa $8,8 \times 10^{10}$ TBC (Edinger, 2000). Hoedemaker (1999) preporučuje samo jedan soj *S. aureus* inaktivisan formalinom sa $3,8 \times 10^8$ cfu/ml ili 1×10^{10} mikroorganizama u mililitru (Opdebeeck, 1985). Opisuje se i vakcina koja se sastoji iz dve komponente, i to inaktivisane bakterijske ćelije 10^{10} mikroorganizama u mililitru (komponenta C) i

toksoid (komponenta T) (Watson, 1992). U sastavu vakcine, sem formalinom inaktivisanog mikroorganizma, mogu se dodati još i alfa i beta toksoidi, da bi se povećala imunogenost vakcine (Nordhaug, 1994). U jednoj dozi ove vakcine nalazi se 25×10^9 cfu i 4 mg N-toksoida, koji se sastoji od istih količina alfa i beta toksina. Isti autor navodi kao novu mogućnost u pripremi vakcine protiv mastitisa izazvanog *S.aureus*-om dodavanje proteina A i fibronektin-binding proteina, kao mogućih antigena u aktivaciji aktivnog imunološkog odgovora. Jedan sasvim nov pristup imunizaciji mlečne žlezde dao je O'Brien, koji je lizat *S. aureus* inkorporisao u biodegradabilne partikule koje imaju funkciju da stimulišu produkciju i opsonizaciju antitela (O'Brien, 2001). Xu i saradnici (2011) u svom radu navode mogućnost pripreme vakcine od proteina ćelijskog zida (Fibrinogen-Binding FbsA protein, Sip protein) *Streptococcus agalactiae*.

Kao nosači ili adjuvansi vakcina mogu se koristiti različiti preparati. Najčešće se koristi aluminijum hidroksid - $Al(OH)_3$ (Edinger, 2000; Giraudo, 1997; Han, 2000), koji često na mestu aplikacije preparata daje reakciju tkiva u vidu otoka koji nestaje najkasnije posle dvadeset dana. Zato se polako napušta tehnologija pripreme vakcina gde se kao nosač koristi aluminijum hidroksid. Novi tipovi nosača, kao što su mineralno ulje (Watson, 1996; Opdebeeck, 1985) ili dekstran sulfat (Han, 2000; Guidry, 1994) sve više su u upotrebi zbog njihove osobine da stimulišu sintezu IgG_2 antitela. Njihov nedostatak je visoka cena, što ograničava njihovu širu upotrebu. U literaturi se može naći da se kao nosač vakcine koristi Freundov nekompletni adjuvans - FICA (Opdebeeck, 1985; O'Brien, 2001). Postoje pokušaji da se napravi nosač vakcine na biljnoj osnovi. U tu svrhu koristi se čvrsti ekstrakt ginsena (ženšen), odnosno purifikovani ženšen i aluminijum hidroksid kao adjuvansi u vakcini koja je napravljena od inaktivisanih ćelija *S. aureus* (Hu, 2003), kao i sojino ulje (Chang, 2008). Površinski proteini i polisaharidi *S. aureus* mogu se koristiti kao komponente subjediničnih vakcina (Foster, 1991).

Imunoprofilaksa i rezultati imunoprofilakse. Vakcina može da se aplikuje intramamarno, parenteralno (subkutano) u regiju vrata i direktno u supramamarni limfni čvor ili u njegovu okolinu. Aplikacija vakcine direktno u mlečnu žlezdu uglavnom je napuštena, zbog velikog otoka i reakcije same mlečne žlezde na nosače u vakcini. Još uvek su podeljena mišljenja o efikasnosti davanja vakcine u supramamarni limfni čvor

ili subkutano u regiju vrata. Aplikacija vakcine u limfni čvor daje nešto viši titar antitela u mleku, nego aplikacija vakcine parenteralno u regiju vrata. Ali takav način aplikacije vakcine dovodi do jakog lokalnog zapaljenja limfnog čvora, koji otiče i veoma je bolan (Nordhaug, 1994; Hoedermaker, 1999). Zbog toga se sve više istraživača opredeljuje za davanje vakcine parenteralno-subkutano u regiju vrata ili subkutano u regiju limfnog čvora, jer je takav način jednostavan za aplikaciju, a izbegnute su i lokalne reakcije tkiva na vakcinu (Giraud, 1997; Watson, 1996).

Brock i saradnici su 1975. godine proizveli eksperimentalnu vakcinu sastavljenu od formalinom inaktivisanih ćelija tri soja *S. aureus*: BB, Mexi i *S. aureus* 3528. Vakcinu su jednoj grupi aplikovali intramuskularno, a drugoj intramamarno. Nisu dobili povećanje nivoa ukupnih imunoglobulina IgM, IgG1, IgG2 i IgA, ni u serumu, niti u mleku, u odnosu na kontrolnu nevakcinisanu grupu. Kod pokušaja veštačke infekcije samo sa sojem 3528 nije uspela infekcija vakcinisanih grupa, za razliku od Mexi i BB gde je uspela veštačka infekcija. Autori su zaključili da na ovaj način nije moguće prevenirati pojavu mastitisa (Brock, 1975). Radovi koji posle toga slede, ipak pokazuju suprotne rezultate.

Bivalentnu vakcinu protiv stafilokoknog i streptokoknog mastitisa pripremio je Opdebeek 1982. godine, a vakcina je bila pripremljena od inaktivisanog soja *S. aureus*, *Str. agalactiae* i stafilokoknog alfa toksoida. Krave su vakcinisane u supramamarni limfni čvor, a ELISA test je pokazao značajno povećanje nivoa antitela u mleku vakcinisane grupe.

Liofilizirani bakterin, resuspendovan u Freundovom adjuvansu, je još jedan način pripreme vakcine (Opdebeek, 1985). Vakcina je sadržavala 3×10^{10} formalinom inaktivisanih mikroorganizama *S. aureus* u ml. Dizajn ogleđa se sastojao od dva eksperimenta. Eksperiment 1 čine sedam krava koje su sedam dana pred teljenje dobile jednokratno 5 ml vakcine u regiju ingvinalnog limfnog čvora, a kontrolne životinje dobile su istu količinu i na isti način placebo. Drugu eksperimentalnu grupu činilo je sedam krava koje su vakcinisane i revakcinisane u razmaku od 21 dan istom vakcinom, ali sa dodatkom površinskog bakterijskog antigena, u istu regiju. Kontrolnim grupama data je placebo vakcina. Nivo specifičnih antitela u serumu prvog eksperimenta, rađenih ELISA testom, kod kontrolnih krava iznosio je u proseku oko 402 ± 60 , a u mleku 13 ± 2 absorbansi. Kod vakcinisanih krava u toku teljenja nivo specifičnih antitela u serumu

bio je 1750 ± 512 , sa pikom od 2833 ± 543 absorbansi 21 dan posle telenja. Nivo antitela u mleku vakcinisane grupe bio je 429 ± 133 absorbansi u istom periodu. Nivo specifičnih antitela u drugom eksperimentu iz mleka i seruma nije pokazivao značajne razlike između kontrolne i vakcinisane grupe. Merenje titra specifičnih antitela rađeno je tzv. sendvič ELISA testom u specijalizovanim laboratorijama. Ovi eksperimenti su pokazali da je dobro pripremljena vakcina, kao i odabrani antigen, presudan za dobre efekte vakcine, i da dobro pripremljen bakterin (inaktivisana bakterijska ćelija) može biti mnogo efikasniji imunogen, nego površinski bakterijski antigen. Pokušano je agar gel tehnikom da se odrede specifična antitela u obe eksperimentalne grupe, ali je sama tehnika bila nedovoljno osetljiva da detektuje antitela u mleku.

Centrifugiranjem *Streptococcus agalactiae* na 1500 obrtaja u minuti uz dodatak Dulbecco fosfatnog pufera izdvaja se Protein X koji je sastavni deo površinskog proteina, a koji bi trebao, na osnovu radova Rainard i saradnika iz 1991, da bude sastavni deo vakcine protiv streptokoknog mastitisa. Protein X podstiče opsonizaciju antitela u prevenciji mlečne žlezde protiv streptokoknih mastitisa.

Veoma detaljan opis eksperimenta i načina vakcinacije dao je Watson (1992). Vakcina je pripremljena kao monovalentna, ali od nekoliko sojeva *S. aureus*. Upotrebljeni su sojevi *S. aureus* JG80, CH-1, 195Q i *S. aureus* 32V, koji su izolovani iz mleka krava sa kliničkim mastitisom. Komponenta C vakcine sadržavala je mrtve bakterijske ćelije soja JG80 u količini od 10^{10} bakterija u ml. Komponenta T napravljena je od soja JG80 i sadržavala je toksoid od istog broja mikroorganizama kao komponenta C. Komponenta G je pripremljena od soja 195Q i inaktivisanog toksina. Vakcina sastavljena od ove tri komponente zavedena je kao internacionalni patent pod brojem PCT/Au86/00134. Eksperimentalni dizajn se sastojao od četiri različito postavljena eksperimenta. U prvom eksperimentu komponenti C je dodat dekstran sulfat u koncentraciji od 50 mg/ml. Vakcina je aplikovana 21 dan posle telenja u količini od 1 ml, subkutano sa medijalne strane levog buta i 1 ml komponente T u medijalnu stranu desnog buta. U eksperimentalnu grupu uključeno je 7 krava i isto toliko kontrolnih jedinki. Revakcina je ponovljena posle dve nedelje. Posle 21 dan kod svih 14 krava pokušana je veštačka infekcija suspenzijom *S. aureus* CH-1 u količini od 1000 cfu/ml. Kliničke znake mastitisa pokazala je jedna od sedam vakcinisanih i tri od sedam nevakcinisanih krava. Nije bilo značajnijeg porasta imunoglobulina posle primarne

vakcinacije, ali posle sekundarne vakcinacije nivo antikapsularnih antitela (IgG₁ i IgG₂) pokazivao je značajno povećanje kod vakcinisanih jedinki u odnosu na kontrolne. Broj SCC (*Somatic cell count* - broj somatskih ćelije u 1 ml mleka) nije pokazao značajne razlike između grupa. U drugom eksperimentu vakcina se sastojala od kombinacije komponente C i T u količini od po 1ml, kao kod prvog eksperimenta. Preparat je aplikovan u levu i desnu medijalnu stranu buta, dva meseca pred telenje krava u prvoj eksperimentalnoj grupi. Dva meseca posle telenja, kod svih krava pokušana je veštačka infekcija sa 1 ml kulture *S. aureus* 32V (40 cfu), koja je aplikovana intramamarno. Posle infekcije, četiri vakcinisane i šest kontrolnih krava pokazale su znake kliničkog mastitisa, iako je nivo specifičnih antitela bio veći kod vakcinisane, u odnosu na nevakcinisanu grupu. Treći eksperiment se sastojao od dve grupe krava (pet oglednih i sedam kontrolnih). Vakcina se sastojala od 1 ml komponente C i po 0,5 ml komponente T i G. Dekstran sulfat (400 mg) i 3 ml Freundovog nekompletnog adjuvansa su dodati vakcini. Ogledna grupa je vakcinisana dva meseca pre telenja, duboko intramuskularno u glutealnu muskulaturu i revakcinisana posle tri meseca na isti način. Veštačka infekcija je izazvana intramamarnom aplikacijom *S. aureus* 195Q (50 cfu), u količini od 1 ml u svaku četvrt, u vreme revakcinacije. Nakon infekcije, četiri kontrolne krave pokazale su znake kliničkog mastitisa, sa poremećajem opšteg zdravstvenog stanja, kao i promenama u mleku, dok vakcinisane krave nisu pokazale znake mastitisa. Nivo specifičnih pseudokapsularnih antitela vakcinisanih grupa pokazao je znatno povećanje u odnosu na kontrolne jedinke. Četvrti eksperiment se nadovezuje na prethodni, tako što je mesec dana nakon veštačke infekcije, ponovo pokušana nova intramamarna infekcija sa drugim sojem *S. aureus* 32V (u količini od 240 cfu u ml). Kod tri kontrolne krave pojavili su se znaci kliničkog mastitisa, za razliku od vakcinisanih, gde su simptomi izostali. Nivo specifičnih pseudokapsularnih antitela bio je visok kod vakcinisanih grla. Povećan nivo antitela se duži vremenski period održavao u statistički značajnom titru, dodatkom Freundovog adjuvansa u 3. i 4. eksperimentu, što pokazuju i njihovi rezultati intramamarnih infekcija, kao i titra antitela u serumu. Nivo antitela u radu mereni su ELISA testom u specijalizovanim laboratorijama u Izraelu (1. i 2. eksperiment) i u SAD (3. i 4. eksperiment).

Veoma zanimljive rezultate dobio je Nickerson (1993), kada je vakcinu protiv infekcije vimena izazvane bakterijom *S. aureus* aplikovao na dva različita načina u

periodu zasušenja krava. Jedna grupa krava primila je vakcinu intramuskularno, a druga subkutano u regiju supramamarnog limfnog čvora, dok treća grupa nije vakcinisana. Četiri nedelje kasnije pokušana je veštačka infekcija sa intramamarnom aplikacijom *S. aureus*. Rezultati intramamarnih infekcija su pokazali da se u kontrolnoj grupi kod 92% krava javio mastitis. U eksperimentalnim grupama bolji rezultati su dobijeni u grupi kojoj je vakcina aplikovana intramuskularno, gde je svega 36% krava pokazalo znake mastitisa, u odnosu na grupu kojoj je vakcina data u regiju limfnog čvora, gde je 60% krava obolelo od mastitisa. Intramuskularni način davanja vaccine bi imao na osnovu ovog rada prednost kod izbora mesta aplikacije vaccine.

Slično prethodnim vakcinama, Guidry (1994) je vakcinu pripremio tako što je *S. aureus* inaktivisao 1% formalinom, ispirao fosfatnim puferom i dodao dekstran sulfat. Vakcina je sadržavala 5×10^9 cfu/ml, 500 mg dekstran sulfata i aplikovana je u supramamarni limfni čvor. Nivo specifičnih stafilokoknih antitela IgG₁ u serumu pokazao je značajni porast (oko 1 apsorbance-OD) u odnosu na kontrolnu grupu ($P < 0,01$) i održavao se na visokom nivou i preko 120 dana. Nivo IgG₂ sporije je dostigao statistički značajan nivo ($P < 0,01$) i mnogo brže je njegov nivo pao za isti vremenski period na 0,5 OD. Imunoglobulini klase M za period od 30 dana postigli su statistički značajno povećanje u odnosu na kontrolne grupe ($P < 0,05$) i zadržao se tokom perioda od 120 dana na zavidnom nivou od 0,60 OD. Imunoglobulini klase A nisu pokazali značajnije povećanje u odnosu na kontrolnu grupu, mada je iz literaturnih podataka poznato da se nivo IgA povećava kod intramamarnog davanja antigena, jer je to sekretorni imunoglobulin. Nivo antitela u serumu meren je ELISA testom, koji je sastavljan iz delova poznatih proizvođača biohemijjskih proizvoda. Za vreme trajanja oglada praćena je i pojava mastitisa kod vakcinisanih krava, kod kojih se značajno smanjila pojava mastitisa u odnosu na kontrolne krave.

Nordhaug-ova (1994) monovakcina sastojala se od formalinom inaktivisanih ćelija *S. aureus*, i inaktivisanog alfa i beta toksina. Kao adjuvans je korišćeno mineralno ulje i deterdžent (Montanide 103, Francuska), kao gotov i zaštićen dodatak. Jedna doza od 2,5 ml ove vaccine je sadržavala je 25×10^9 cfu i 4 mg α , β toksoida, a aplikovana je grupi od 58 krava, u regiju supramamarnog limfnog čvora. Kontrolnu grupu činilo je 50 muznih krava. Efekti vaccine su praćeni kroz pojavu manifestacije simptoma kliničkih i subkliničkih mastitisa, kao i promene broja SCC u mleku. Rezultati su pokazali da su u

kontrolnoj grupi tri krave imale znake kliničkog mastitisa, za razliku od vakcinisane grupe, gde nije bilo kliničkih mastitisa. Subklinički mastitisi javili su se kod 14% životinja u kontrolnoj i 8,6% u vakcinisanoj grupi. Broj SCC u mleku tokom celog perioda laktacije, statistički nije značajno povećan između kontrolne i vakcinisane grupe.

Watson (1996) je vakcinu koju je patentom zaštitio pod brojem PCT/AU86/00134 1992. godine, ispitao na malom broju životinja i ponovo uključio u ogled na velikom broju eksperimentalnih životinja (1819 krava). Vakcina je aplikovana dva meseca pred očekivano teljenje, a zatim je data revakcina mesec dana pred telenje, duboko intramuskularno u regiju vrata. Tokom eksperimenta, klinički mastitisi su se javili kod 273 krave, od toga u kontrolnoj grupi 154, kod 67 krava mastitis je bio izazvan bakterijom *S. aureus*, a kod vakcinisanih 119 (od toga je 45 mastitisa izazvanog bakterijom *S. aureus*). Veoma je zanimljivo da su se kod junica obe eksperimentalne grupe klinički mastiti javili samo kod pet kontrolnih i kod 4 vakcinisane junice. Broj subkliničkih mastitisa vakcinisanih krava nije značajno smanjen u odnosu na kontrolnu grupu, ali je broj kliničkih mastitisa značajno smanjen. Vakcina može da se koristi kao profilaksa subkliničkih mastitisa, kao i za smanjenje kliničkih mastitisa u stadima sa ozbiljnim problemima sa mastitisom. Veoma je zanimljiv podatak da je u ogledu povećan broj kliničkih mastitisa izazvanih bakterijom *S. uberis* (22,7% slučajaja mastitisa).

Polivalentna vakcina Girauda i sar. (1997) sastojala se od *S. aureus* RC-1v, *S. aureus* RC-2, *Streptococcus uberis* RC-3 i *Streptococcus agalactiae* RC-4. Sve bakterijske ćelije su inaktivisane formalinom (0,4% vol/vol) i centrifugovane na 7.000 rpm (obrta u min), u trajanju od 20 minuta, na temperaturi od 4°C. Posle centrifugovanja i odlivanja supernatanta, izvršeno je resuspendovanje ćelija u fiziološkom rastvoru. Svaka doza od 5 ml vakcine sadržavala je 1×10^{10} cfu/ml *S. aureus*, 4×10^9 cfu/ml *Streptococcus sp.* i čvrstog dela kapsule *S. aureus* RC-1v u količini od 1×10^{10} ćelija u ml, što je iznosilo oko 5 mg kapsule po dozi vakcine. Aluminijum hidroksid je dodat kao adjuvans u količini od 3,5% wt/vol. Eksperiment je urađen na kravama koje su podeljene u tri grupe. U prvoj grupi je bilo 10 krava i vakcina je aplikovana subkutano u regiju vrata, dva meseca pred očekivani partus, a revakcina je data mesec dana pred očekivano vreme teljenja. Drugoj grupi od 10 krava, vakcina je

aplikovana jednu nedelju posle teljenja i revakcina 5 nedelja posle teljenja. Kontrolna grupa (10 krava) je bila treća eksperimentalna grupa kojoj je placebo aplikovana na isti način kao i kod prve eksperimentalne grupe. Efekat vakcine praćen je kroz pojavu kliničkih i subkliničkih mastitisa, kao i broja SCC u mleku. Rezultati vakcinisanja kod prve i druge eksperimentalne grupe pokazuju da je ukupan broj kliničkih i subkliničkih mastitisa (4,1% i 2,5%) značajno niži nego kod kontrolne grupe (10,2%). Broj latentnih *S. aureus* infekcija vimena bio je niži nego u kontrolnoj grupi, odnosno procenat intramamarnih infekcija (IMI) je kod prepartalne i postpartalne grupe iznosio 2,6% i 3,5% ($P < 0,0001$), u odnosu na procenat u kontrolnoj grupi (8,6%). Ovi rezultati pokazuju veliko smanjenje kliničkih i subkliničkih mastitisa izazvanih *S. aureus*-om, kao smanjeni broj streptokoknih infekcija kod vakcinisanih krava. Nije nađeno da je broj somatskih ćelija (SCC) značajno povećan kod vakcinisanih u odnosu na kontrolnu grupu, što autor tumači kao dobru osobinu vakcine, jer je broj SCC u mleku manji od 500.000, što ukazuje da je mleko higijenski ispravno za upotrebu.

Ispitivanjem efikasnosti vakcine protiv *S. aureus*, u kojoj je kao adjuvans korišćen rekombinovani bovini interleukin-2 (rBoIL-2), pratili su u svom radu Derosa i sar. (1997). Eksperiment se sastojao od tri grupe ispitivanih krava. Prvoj grupi krava aplikovana je vakcina u kojoj je kao adjuvans korišćen rastvor soli (fiziološki rastvor), drugoj grupi je aplikovana vakcina sa Freundovim nekompletnim adjuvansom, a u trećoj je ispitivan rekombinovani bovini interleukin. Efekti vakcine ispitivani su merenjem titra antitela posle pokušaja intramamarne infekcije unošenjem 100 kolonija *S. aureus*. Krave tretirane vakcinom, sa fiziološkim rastvorom kao adjuvansom, imale su veći titar antitela u serumu u odnosu na ostale grupe. Bovini rekombinovani interleukin kao adjuvans pokazao je znatno veći titar antitela u mleku u odnosu na ostale ispitane grupe. Interleukin kao adjuvans je bio mnogo slabiji od do sada korišćenih poznatih adjuvansa.

Visoko specifična štalska vakcina, koja je napravljena u Tornau, prvi put je upotrebljena za imunizovanje stada u Nemačkoj (Hoedemaker, 1999). Jedna doza vakcine sadržavala je $3,8 \times 10^8$ cfu/ml formalinom inaktivisanih ćelija *S. aureus*. Životinje su podeljene u dve grupe (kontrolna i ogledna), a birane su metodom slučajnog izbora. Vakcina je davana dvokratno, pet i dve nedelje pred očekivani termin teljenja. Efekti vakcine praćeni su kroz pojavu kliničkih i subkliničkih mastitisa i broja

SCC u mleku. Mleko je uzimano jednom mesečno. Nije nađena statistička značajnost između grupa u smanjenju pojave mastitisa, kao što nije bilo statističke značajnosti i u broju SCC u mleku.

Jedan sasvim nov pristup imunizovanju mlečne žlezde dao je O'Brien (2000) koji je od *S. aureus* izdvojio polisaharide serotipa 5, 8, i 336 i njih konjugovao u biodegradabilne partikule koje su po sastavu poly-DL-lactid-co-glikolid. Partikule (zrnca) imaju funkciju stimulacije produkcije i opsonizacije antitela. Konjugovani polisaharid je emulgovao sa Freundovim adjuvansom. Posle jednokratne aplikacije obe vakcine, kod svih oglednih životinja je ustanovljen značajno visok nivo antitela IgG₁ i IgG₂ bez povećanja nivoa IgM klase imunoglobulina.

Opsežna ispitivanja obavio je Edinger (2000) ispitujući vakcinu pripremljenu od dva soja *S. aureus*, pri čemu je uzročnik inaktivisan formalinom. Aluminijum hidroksid u količini od 20% vol dodat je vakcini kao nosač i 0,5% fenola kao konzervans. Vakcina je sadržavala ukupnih bakterijskih ćelija (TBC/ml) u količini od 1×10^{11} jednog soja i $8,8 \times 10^{10}$ drugog soja. Vakcina je aplikovana pet nedelja pred očekivano teljenje, a revakcina dve nedelje pred očekivano teljenje. Efekti imunoprofilakse praćeni su kroz pojavu kliničkih i subkliničkih mastitisa i broja somatskih ćelija u mleku. U toku tri meseca praćenja nije nađena značajna razlika između grupa u pojavi mastitisa izazvanih *S. aureus*. Broj SCC u mleku je bio niži kod vakcinisane grupe u odnosu na kontrolnu, ali statistički je bilo značajno treće uzimanje mleka 4 meseca od vakcinisnja. Mleko je uzimano jednom mesečno, do pojave prvih znakova intramamarne infekcije. Moguće je da se dobiju bolji rezultati, ako se sa vakcinisanjem krene u ranijem stadijumu graviditeta, kao i da se determiniše faktor *S. aureus*, koji bi bio bolji imunogen i samim tim dao bolje rezultate vakcinacije.

Visoko specifičnu štalsku vakcinu protiv mastitisa izazvanog *S. aureus*-om napravili su Tenhagen i sar. (2001). Efekti vakcine praćeni su preko pojave intramamarnih infekcija (IMI), pojave kliničkih i subkliničkih mastitisa i broja SCC u mleku. Oglednoj grupi (164), vakcina je aplikovana pete i druge nedelje pred očekivano teljenje. Kontrolna grupa (157) dobila je placebo vakcinu. Mleko je skupljano jednom mesečno tokom tri naredna meseca, od dana teljenja. U toku prva tri meseca između grupa nije nađena statistička značajnost pojave mastitisa izazvanog *S. aureus*-om. Broj SCC u mleku je bio niži kod vakcinisane grupe u odnosu na kontrolne. Visoko

specifična štalska vakcina koja je ovde upotrebljena nije pokazala zadovoljavajući efekat smanjenja IMI i SCC u mleku na ovoj oglednoj farmi.

Nov pristup imunizovanju mlečne žlezde dao je O'Brien (2001) koji je lizat *S. aureus* inkorporisao u biodegradabilne partikule koje imaju funkciju stimulacije produkcije i opsonizacije antitela. Biodegradabilne partikule su po sastavu poly-DL-lactid-co-glikolid koji se veoma sporo razgrađuje u organizmu i postepeno otpušta antigen *S. aureus*. Eksperiment se sastojao iz četiri ogledne grupe, sa po četiri krave u svakoj grupi. Prvoj grupi aplikovan je liofilizat *S. aureus* rastvoren u fiziološkom rastvoru, drugoj liofilizat *S. aureus* sa Freundovim adjuvansom, trećoj liofilizat *S. aureus* inkorporisan u partikule sa dodatkom fiziološkog rastvora i četvrtoj grupi je aplikovan liofilizat *S. aureus* inkorporisan u partikule, ali sa dodatkom Freundovog adjuvansa. Vakcina je data u količini od 1 ml u okolinu supramamarnog limfnog čvora i 1 ml u lopatičnu muskulaturu. Antigeni ugrađeni u partikule su od 20 - 52 nedelje posle imunizovanja štitili mlečnu žlezdu od adherencije *S. aureus*, sprečavajući aktivaciju imunološkog odgovora, opsonizirajući neutrofile. Ovaj pristup rešavanju problema mastitisa, jednokratnim aplikovanjem antigena koji osigurava dug period imunosti mlečne žlezde, otvara novi put rešavanju problematike mastitisa.

MASTIVAC-I je zaštićeni patent Leitnera i sar. (2003) pod brojem PTC/IL98/00627, a predstavlja visoko specifičnu vakcinu protiv mastitisa izazvanog *S. aureus*-om. Ispitana je na 228 oglednih krava i 224 kontrolnih grla. Mastitis se javio kod 3 od 228 oglednih (1,3%) krava i kod 6 od 224 (2,7%) krava u kontrolnoj grupi. Zbog malog broja pojave mastitisa u obe grupe, vrednosti nisu mogle statistički da se obrade. Isti je slučaj i sa brojem SCC u mleku.

Jedan nov prilaz načinu pripreme i davanja vakcine, koji bi mogao da omogućiti široku primenu, prikazuje Carter (2003) u svom radu. Osnovu vakcine čini humani citomegalovirus, na čiji plazmid DNA je izvršio direktnu ekspresiju Green Fluorescent protein-GFP stafilokoka (zeleni fluorescein protein koji je obeležen kao pc/DNA3/GFP i proteina A). Ova vakcina je aplikovana pomoću injektora, koji omogućavaju ubacivanje materija pod određenim pritiskom (Ped-o-Jet). Vakcina je aplikovana 6, 4 i 2 nedelje pred očekivani partus u intravulvarnu mukozu. Eksperiment je podeljen u tri grupe, koje su se razlikovale po nosaču vakcine. Prva grupa je dobila vakcinu koja sadrži slani rastvor (10 krava), drugoj grupi je dodat aluminijum fosfat (10 krava) i treća je bila

kontrolna (10 krava). Nivo specifičnih antitela je meren ELISA testom, koji je napravljen u odgovarajućoj specijalističkoj laboratoriji, a merenje efikasnosti celularnog imuniteta vršen je testom proliferacije limfocita. Povećan nivo specifičnih antitela na protein A izmeren je kod 6 od 10 krava, a na GFP izmereno je kod 2 od 10 oglednih krava. Celularni imuni odgovor na protein A detektovan je kod 4 od 10 krava, dok na GFP nije izmeren celularni odgovor. Fosfatni nosač je povećao titar antitela na protein A koji ostaje dugo povećan u cirkulaciji. Na ovaj način pripremljena vakcina može biti efikasni stimulator imunološkog odgovora u borbi sa upornim intramamarnim infekcijama izazvanih bakterijom *S. aureus*.

Efekti trivalentne vakcine protiv *S. aureus* koja je u svom sastavu imala polisaharid kapsule tipa 5 (T5), 8 (T8) i 336 (T336), opisao je Lee (2005) u svom radu. Ogled je podeljen u tri grupe, od kojih je jedna grupa dobila trivalentnu vakcinu koja je pripremljena od tri antigena polisaharida kapsule i od Freundovog nekompletnog adjuvansa (FICA). Druga grupa je primila vakcinu koja je u svom sastavu imala tri polisaharidna antigena i kao nosač aluminijum hidroksid, a treća grupa krava je primila samo Freundov nekompletni adjuvans. Krave su vakcinisane mesec dana i dve nedelje pred očekivni partus. Nivo specifičnih IgG₁ i IgG₂ je bio značajno povećan kod vakcinisanih grupa krava, u odnosu na krave koje su primile samo FICA.

Ogled koji je opisao Abubakar (2006) ukazuje da je grupa pacova koje je vakcinisana i revakcinisana sa inaktivisanom vakcinom protiv *Str. agalactiae* pokazala viši titar antitela, i duže se održao u krvi, nego grupa pacova koja je dobila samo jednu dozu vakcine. Vakcina je pripremljena od formalin inaktivisanog soja *Str. agalactiae* (1×10^9 /ml) i aplikovana pacovima subkutano u dozi od 0,2 ml.

Avais (2007) je izvršio eksperiment na kunićima, kojima je aplikovao subkutanu vakcinu pripremljenu od *S. aureus* (1×10^7 cfu/ml), *Str. agalactiae* (1×10^8 cfu/ml) i *E. coli* (1×10^9 cfu/ml). Na osnovu analize rezultata zaključio je da je maksimalni titar antitela stvoren na *E. coli*, zatim na *S. aureus*, a najmanji na *Str. agalactiae*. U radu je zaključeno da postoji direktna veza u koncentraciji datog antigena i njegovog imunološkog odgovora.

Keskin i saradnici (2007) ispitali su komercijalnu vakcinu (Hipramastivac, HipraLaboratorios S.A. Spain) koja je bila pripremljena od inaktivisanog soja *S. aureus* TC5, inaktivisanog soja *S. aureus* TC8, *E. coli*, *Str. agalactiae*, *Str. uberis*, *S. pyogenes*,

P. aeruginosa i *A. pyogenes*, u dozi od 3 ml. Krave su vakcinisane intramuskulano u mišić vrata, 4 nedelje pred očekivani partus. Na osnovu rezultata koje su Keskin i saradnici dobili nije bilo statističke značajnosti u povećanju titra antitela i broju SCC kontrolne i vakcinisane grupe. Broj SCC vakcinisane grupe nakon partusa iznosio je 710.000, a na kraju eksperimenta 417.000 u 1 ml mleka, a kod kontrolne grupe broj SCC na početku je iznosio čak 976.000, a na kraju oglada 381.000 u 1 ml mleka.

U svom radu Vakanjac i saradnici (2008) opisuju pripremu vakcine čija je doza 5 ml i koja je u svom sastavu imala inaktivisane bakterijske ćelije *S. aureus* JR 3 u količini od 1×10^{10} cfu/ml (I deo vakcine) i 5mg SM kapsule soja *S. aureus* 2286 (II deo vakcine). Krave su vakcinisane dva meseca pred teljenje i revakcinisane mesec dana pred očekivani partus. Srednja vrednost broja SCC kontrolne grupe iznosila je 551.223 ćelija/ml, a kod vakcinisane grupe 582.022 ćelija/ml, što ukazuje da ne postoji značajno povećanje broja somatskih ćelija između ove dve grupe. Tokom celog oglada vrednosti nivoa antitela vakcinisane grupe bile su više od vrednosti nivoa antitela kontrolne grupe. Srednja vrednost nivoa antitela kontrolne grupe iznosila je 0,438 OD, a eksperimentalne 0,697 OD.

Posle jednokratne vakcinacije sa inaktivisanim sojem *Staphylococcus aureus* Middleton i sar. (2008) nisu dobili značajnije povećanje nivoa specifičnih antitela u mleku, niti smanjenje pojave novih infekcija. Krave su vakcinisali jednokratno dve nedelje pred očekivani partus, a uzorke mleka su uzimali jednom mesečno i ispitivali broj SCC, specifična antitela u mleku i pojavu novih infekcija izazvanih *S. aureus*. Ispitivana vakcina nije smanjila broj novih stafilokoknih mastitisa u ogleđnoj i kontrolnoj grupi. Broj SCC ćelija u ispitivanim grupama nije pokazao statističku značajnost. Srednje vrednosti nivoa antitela IgG₁ u ogleđnoj grupi iznosila je OD 0,848, a kontrolne grupe 0.807, dok su vrednosti IgG₂ u ogleđnoj grupi iznosile OD 0,817, a u kontrolnoj grupi OD 0,313.

Iste godine Pellegrino (2008) je ispitao vakcinu pripremljenu od liofiliziranog promenjenog soja *S. aureus* (5×10^8 cfu/ml). Vakcina je aplikovana subkutano u dozi od 3 ml 30 dana pred očekivano teljenje, a revakcinacija je izvršena 10 dana pred partus. Broj SCC vakcinisane grupe krava je bio niži od kontrolne grupe, mada nije postojala statistička značajnost. Za razliku od broja SCC, nivo specifičnih antitela IgG u mleku

vakcinisane grupe bio je statistički značajno povećan u odnosu na kontrolnu grupu krava.

Ahmar (2008) u svojim istraživanjima opisuje pripremu bivalentne vakcine protiv mastitisa izazvanih *S. aureus*-om i *Str. agalactiae*. Vakcina sadrži, u dozi od 5 ml, *S. aureus* u količini od 5×10^{10} /ml i istu količinu *Str. agalactiae*. Mikroorganizmi su inaktivisani sa 0,4% (v/v) formolinom, kao konzervans je dodat timerazol u količini od 0,001% (v/v) i aluminijum hidroksid kao nosač u istoj količini. U ogled su bile uključene dve grupe kunića, od kojih je jedna grupa kontrolna i nije primila vakcinu, a drugoj grupi je aplikovana bivalentna vakcina. Titar specifičnih antistafilokoknih i antistreptokoknih antitela vakcinisane grupe bio je značajno povećan u odnosu na kontrolnu grupu.

Tempelman (2009) je u svom radu dobio značajno povećanje IgA u mleku vakcinisanih krava u odnosu na nevakcinisane. Koristio je vakcinu pripremljenu od *S. aureus* koji je izolovan od krava sa mastitisom, a vakcinu je aplikovao u nazalnu mukozu i to u dozi od 4 ml (0,2 mg/ml ukupnih proteina celih ćelija *S. aureus*), svake dve nedelje. Rezultati rada ukazuju da antitela iz mleka posle imunizacije krava mogu potencijalno da obezbede dovoljan titar antitela protiv infekcije izazvane *S. aureus*-om.

Veliki broj eksperimentalnih grupa postavio je i opisao Perez (2009) u svom radu. Ogled se sastojao od 9 eksperimentalnih i jedne kontrolne grupe. Eksperimentalne grupe od 1 do 5 su primile inaktivisanu bakterijsku ćeliju *S. aureus* (10^{10} bakterija u dozi), nosač vakcine je bio aluminijum hidroksid (grupe 1, 2, 4, 5) i komercijalni nosač vakcine (grupa 3). Eksperimentalne grupe 6, 7, 8 i 9 u sastavu vakcine su primile površinski polisaharid *S. aureus*-a u dozi od 2 mg, a nosači su bili liposomal (6, 7, 9) i mikropartikule u grupi 8. Kontrolna grupa nije primila vakcinu, već samo fosfatni pufer. Eksperimentalne grupe 1, 2 i 3 pokazuju statistički značajan titar antitela (OD 0,400 – 0,600) u odnosu na sve ostale grupe u ogledu (od <OD 0,400).

Vakcina pripremljena od ekstracelularne komponente *S. aureus* SA2H (*slime associated antigen complex SAAC*) pokazala je zadovoljavajuće rezultate. Vakcina je pripremljena od 2×10^{10} bakterija po dozi, sa uljnim nosačem. Ogledne grupe su vakcinisane 45 dana i revakcinisane 35 dana pre očekivanog partusa, dok kontrolna grupa nije primila vakcinu. Rezultati vakcinacije ukazuju da vakcina nije sprečila nastajanje mastitisa izazvanog bakterijom *S. aureus*, ali je značajno redukovala njegovo

pojavljivanje u oglednim grupama. Broj SCC u oglednim i kontrolnoj grupi nije pokazao statističku značajnost (Prenafeta, 2010).

Vakcina koju je Leitner (2011) pripremio, sadrži deo membrane površinskog proteina koji se zove rTRAP (*rekombinantni Target RNAlII Activating Protein*) i sastavni je deo proteina 167 AA i odlika patogenih sojeva stafilokoka. Eksperiment odlikuje veliki broj eksperimentalnih grupa, u cilju utvrđivanja adekvatne doze antigena i odabira odgovarajućeg nosača. Doza antigena koja je pokazala imunogenost kod svih eksperimentalnih grupa kretala se od 54 µg do 100 µg, a nosač jedne grupe je bio ISA 206, a druge aluminijum hidroksid. Nivo antitela u prva tri meseca posle vakcinacije bio je statistički značajno viši kod eksperimentalnih grupa krava, koje su u sastavu vakcine imale nosač ISO 206, za razliku od broja SCC koji je bio viši u kontrolnoj, nego u eksperimentalnoj grupi.

Xu i saradnici (2011) su pripremili bivalentnu vakcinu protiv stafilokoknog i streptokoknog mastitisa, i ispitali njenu efikasnost na miševima. Vakcina je pripremljena od površinskog imunogenog proteina *Streptococcus agalactiae* (Sip) i clamping faktora A (ClfA) *Staphylococcus aureus*, a kao nosač su koristili mineralno ulje. Na osnovu rezultata do kojih su došli, Xu i saradnici su zaključili da ovako pripremljena vakcina statistički značajno podiže nivo IgG₁ u odnosu na kontrolnu nevakcinisanu grupu, kao i na grupu miševa koji su primili samo inaktivisane bakterije *Streptococcus agalactiae* i *Staphylococcus aureus*.

Cheng (2012) je pripremio rekombinantnu stafilokoknu vakcinu enterotoksina A (rSEA), a kao nosač je koristio mikropartikule od poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA). Dijametar partikula PLGA je iznosio oko 5 µm. Vakcina je aplikovana miševima, a deset dana po aplikaciji intraperitonealno je data letalna doza 2×10^9 cfu *S. aureus*. Krv je uzimana svakog dana u cilju određivanja titra specifičnih antitela ELISA testom. Rezultati ogleđa pokazuju snažan humoralni odgovor u povećanju specifičnih antitela protiv rSEA i povećanju preživljavanja inficiranih miševa letalnim dozama *S. aureus*.

2.5.2. Monitoring kliničkih i subkliničkih mastitisa izazvanih bakterijama *S. aureus* i *Streptococcus agalactiae*

Dosadašnji način praćenja i kontrole kliničkih i subkliničkih mastitisa svodio se na primenu brzih štalskih metoda. Klinički mastitisi u dijagnostikovanju nisu problem, zbog postojanja jasnih klinički ispoljenih simptoma, ali veliki problem predstavljaju subklinički mastitisi. Najčešće metode koje se koriste u dijagnostici ovih mastitisa su Whiteside test i CMT test (kalifornija mastitis test, Šalmov test).

Vajtsajd test (*Whiteside test*)

Vajtsajd test se zasniva na reakciji natrijumhidroksida i nukleinske kiseline leukocita, pri čemu se stvara natrijumova so nukleinske kiseline. Proba se izvodi na taj način što se na mikroskopsku ploču stavi pet kapi mleka i dve kapi 1 mmol/l rastvora NaOH, a zatim staklenim štapićem dobro izmeša tečnost na površini oblika kruga u prečniku 3 cm. Ako mleko potiče iz zdravog vimena, tečnost ostaje homogeno zamućena, dok u mleku sa povećanim brojem ćelija za nekoliko sekundi do pola minute izdvoje sitne ili krupne pahuljice u bistroj tečnosti. Kod jako pozitivne reakcije obrazuje se gusta sluzava masa.

Na osnovu Vajtsajd testa može se približno odrediti broj leukocita u 1 ml mleka.

Obeležavanje nalaza vrši se prema jačini reakcije:

homogeno zamućenje	-
sitne pahuljice, do milion leukocita	+
krupnije pahuljice, od 2 do 5 miliona leukocita	++
krupne pahuljice, do 7 miliona leukocita	+++
sluzava masa preko 10 miliona leukocita	++++

Kalifornija mastitis test (CMT test, Šalmov test)

Kalifornija mastitis test se zasniva na dejstvu površinski aktivne materije (alkilarilsulfonat) na DNK polimer iz leukocita u mleku. Pri tome se odvaja DNK, a proteinski deo spontano prelazi u gel. Za ovu reakciju je potrebno prisustvo živih leukocita u kojima je DNK sposoban da reaguje sa površinski aktivnom materijom. Ovo je razlog što reakcija izostaje posle dužeg stajanja, kao i u hladnom mleku. Stoga je ovaj

test isključivo štalska proba. Za izvođenje ovog testa potreban je reagens i plastična posuda izdijeljena u četiri dela (testator) za uzimanje mleka iz svake četvrti. Mleko se izmuze iz svake četvrti u odgovarajući odeljak, posuda se nagne skoro uspravno da se višak mleka odlije i u odeljcima ostane potrebna količina mleka koja iznosi oko 2 ml. Zatim se pipetom doda oko 2 ml reagensa, dobro izmeša i očita se broj leukocita u 1 ml na osnovu date šeme:

Negativna	-
(ispod 200.000 leukocita, bez promena u konzistenciji);	
Sumnjiva	±
(do 550.000 leukocita, neznatna promena u konzistenciji);	
Slabo pozitivna	+
(do 1.500.000 leukocita, postepeno zgrušavanje mleka);	
Izrazito pozitivna	++
(do 5.000.000 leukocita, momentalno zgrušavanje mleka);	
Jako pozitivna	+++
(preko 5.000.000 leukocita, stvara se želatinozna masa).	

Ove brze štalske metode još uvek su najčešći način dijagnostikovanja subkliničkih mastitisa, mada se sve češće u literaturi nalaze radovi u kojima je praćenje subkliničkih mastitisa vršeno pomoću ELISA testa. Primenom imuno ELISA testa mogu se izmeriti antigeni direktnom ELISA metodom (sendvič metod) ili antitela (indirektni ili kompetitivni test). U ELISA testu najčešće se koriste enzimi alkalna fosfataza ili peroksidaza. U indirektnom ELISA testu, za određivanje antitela, poznati antigen se nanosi na polistirensku mikrotitar ploču, u koju se tada nanose ispitivani uzorci i kontrole. Posle inkubiranja, polja se isperu puferskim rastvorima i dodaje se antiglobulin konjugovan enzimom (Quinn, 2002). Na kraju se dodaje specifičan supstrat, indikator koji razvija reakciju u vidu pojave boje čiji je intenzitet proporcionalan količini prisutnih antitela u ispitivanom serumu i očitava se pomoću spektrofotometra (ELISA čitač), a izražava se preko Optical Density (OD), odnosno optičke gustine.

Otkrivanje antigena u uzorku može da se izvede pomoću antitela koja su konjugovana enzimom. Na polistirensku mikrotitracionu ploču nanose se specifična antitela, dodaje se ispitivani uzorak i ako je antigen prisutan u uzorku vezuje se za antitela i ostaje vezan i posle ispiranja. Zatim se dodaju sekundarna antitela obeležena enzimom koja su specifična za antigen, a posle dodavanja supstrata dolazi do razvijanja boje. Intenzitet boje je direktno proporcionalan količini ispitivanog antigena, a izražava se preko OD. Većina ovih testova nije komercijalnog tipa, nego se sastoje iz delova u specijalizovanim laboratorijama.

Standardni test za određivanje titra antitela u mleku za *S. aureus* opisao je u svom radu Grove (1992). *ProStaph Elisa test* (ProStaph, ProCorp. Sterling, VA) omogućava 97% tačnost rezultata u otkrivanju intramamarnih infekcija izazvanih *S. aureus*-om. Test pokazuje 92% tačnosti u otkrivanju pozitivnih grla i 100% tačnosti u otkrivanju krava negativnih na *S. aureus*. Autor smatra da ovaj test može biti od velike pomoći farmerima u samokontroli stada na subkliničke mastitise. Iste godine El-Rashidy i Fox (1992) ispituju još jedan standardni test *Staph-Trac* (Analytab Products, Plainview, NY) za dijagnostikovanje intramamarnih infekcija izazvanih *S. aureus*-om. Ispitivano mleko se sipa u polja mikrotitracione ploče na koje je apsorbovan antigen *S. aureus*. Ploča se inkubira 30 minuta na 37°C, i dodaje se anti-bovini imunoglobulin, koji je konjugovan sa peroksidazom. Nakon toga se ploča ispere, doda enzim substrat i ponovo inkubira. Optička gustina (OD), odnosno prisustvo antitela, čita se kolorimetrijski na 490 nm. Ovaj test je pokazao nedostatak u čitanju rezultata intramamarnih infekcija dajući do 15% lažno negativnih rezultata, što zahteva dodatna ispitivanja testa u cilju njegove komercijalne primene. Rogerson (2000) opisuje komercijalni test za određivanje specifičnih IgG1 (*Coltest*) i IgG2 (*Mastest*) u mleku ovaca i koza i *Bovtest* za određivanje antitela kod krava. Ovi testovi su od velike pomoći u mlekarama na Novom Zelandu, gde se koriste za ispitivanje mleka koje potiče od životinja sa subkliničkim mastitisima izazvanih *S. aureus*-om. Sličan komercijalni test *Staphylococcus Aureus Antibody Test Kit*, (VMRD, USA) je opisao Fox (2000), a njegova upotreba je u otkrivanju specifičnih anti *S. aureus* antitela u mleku krava. Prednost ovih komercijalnih testova je u otkrivanju antitela u mleku i veoma su jednostavni za upotrebu. Ranije korišćenje ELISA testova bilo je specifično za upotrebu

samo za serume, a test se sastavljao iz mnogo delova koji su pripremljeni u posebnim laboratorijama.

U pripremi vakcina protiv stafilokoknih infekcija mlečne žlezde različiti autori koriste inaktivisane cele mikroorganizme, zatim delove mikroorganizma *S. aureus*, ili toksoide. To je jedan od razloga zašto se isti autori opredeljuju za pripremu sopstvenih ELISA testova za *S. aureus* (Opdebeeck, 1985; Loeffler, 1987; El Rashidy, 1992; Watson, 1992; Nicerson, 1993; Guidry, 1994; Nordhaug, 1994; Carter, 2003; Lee, 2005) ili *Str. agalactiae* (Abubakar, 2006; Avais, 2007; Xu, 2011).

Lee (2005) je u svom radu, kao i mnogi pre njega, opisao radni protokol pripreme ELISA testa u cilju utvrđivanja specifičnih antitela u mleku. U 96 mesta mikrotitar ploče (Immunolon, USA) sipao je antigen u količini od 1 µg/ml (T5, T8, T336), kao i ispitivane uzorke mleka, i inkubirao ih na 22°C. Ploče je blokirao sa 1% pilećim albuminom (Sigma Company) na 22°C jedan sat. Ploče su ispirane sa puferom PBSS i držane preko noći na 4°C. Zatim su ploče tri puta ispirane sa zečijim antitela IgG₁, a nakon toga je u ploče dodavan ovčiji antitela IgG (1:2000) (Kirkegaard and Perry, USA), da bi se na kraju izvršila inkubacija na 37°C. Posle dodavanja stop rastvora, rezultati se čitaju na OD 405.

Chang (2008) je opisao sličan protokol za pripremu ELISA testa, samo je za antigene koristio stafilokokni enterotoksin tip C (SEC) i ispitivane uzorke mleka. Posle inkubiranja ploče (Costar, USA), u bazenčice je dodat 1% goveđi serum albumin (Sigma Company), da blokira prazna mesta, i ponovo je izvršena inkubacija ploče na 37°C, jedan sat. Posle ispiranja, u bazenčice je dodat peroksidaza konjugat antigoveđi IgG, i inkubirano ponovo na istoj temperaturi. Posle dodavanja stop reagensa ploče su čitane na OD 405.

Specifična IgG antitela određivana pomoću ELISA testa na miševima, opisana su i u radu Xu i saradnika (2011). Protokol je sličan kao i kod napred pomenutih autora. U 96 bazenčica mikrotitar ploče (Falcon, Canada), pipetiran je specifični antigen (0.1 µg rSip - *Str. agalactiae* i 0.1 µg ClfA - Clamping faktor *S. aureus*), i inkubiran na 37°C, jedan sat. Na ploču su konjugovana kozija antimišija IgG antitela, koja su ponovo inkubirana na 37°C, 30 minuta. U bazenčice je potom dodat tetrametilbenzidin i HRP rastvor, da se razvije reakcija. Enzimska reakcija je prekinuta dodavanjem stop rastvora, a reakcija je čitana na OD 630 nm.

Detaljan opis pripreme ELISA testa u svom radu opisao je Chen (2012), koji je ovaj test primenio na određivanju specifičnih antistafilokoknih antitela na miševima. U 96 bazenčića mikrotitar ploče (Corning, USA) pipetirano je 0,5 µg/mL stafilokoknog enterotoksina (SEA), a ploče su inkubirane na 4°C, 24h. Ploče su ispirane tri puta i blokirane 5% mlečnom masti, na 37°C, dva sata. Posle ispiranja, dodato je 100µL mišijeg serma i ponovo inkubirano jedan sat, na istoj temperaturi, Posle inkubacije, ploče su ispirane i u bazenčiće je potom dodat koziji antimišiji IgG (Jackson Laboratories) i ponovo inkubirano na istoj temperaturi. Na kraju je dodat rastvor tetrametilbenzidin i inkubirano još 15 min na 37°C i posle dodavanja stop rastvora ploče su čitane na OD 450 nm.

3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja

S obzirom na rezultate drugih istraživača i sopstvenih preliminarnih istraživanja, a imajući u vidu problem koji predstavljaju mastitisi uzrokovani bakterijama *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus agalactiae*, cilj istraživanja jeste priprema i ispitivanje vakcine čija bi se efikasnost ogledala u smanjenju nastanka kliničkih i subkliničkih mastitisa izazvanih navedenim uzročnicima.

Zadaci istraživanja

S obzirom na cilj istraživanja, postavljeni su sledeći zadaci:

- ispitivanje zdravstvenog statusa životinja i vimena pre početka i tokom oglada;
- izolovanje i identifikovanje *Staphylococcus aureus* iz mleka ispitivanih krava;
- izolovanje i identifikovanje *Streptococcus agalactiae* iz mleka ispitivanih krava;
- priprema vakcine od autohtonih sojeva *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus agalactiae*;
- ispitivanje proizvedene vakcine na neškodljivost, netoksičnost i apirogenost na miševima, zamorcima, ovcama i govedima;
- ispitivanje efikasnosti dobijene vakcine u sprečavanju pojave mastitisa na mlečnim grlima;
- ispitivanje uzoraka mleka na prisustvo mikroorganizama, kao i broja somatskih ćelija kod krava uključenih u ogled;
- određivanje koncentracije imunoglobulina G klase u uzorcima mleka krava uključenih u ogled.

4. MATERIJAL I METODE RADA

4.1. Ispitivanje uzoraka mleka

4.1.1. Bakteriološko ispitivanje uzoraka mleka

Sa farme muznih krava, na kojoj je vršeno ispitivanje efikasnosti vakcine proizvedene od autohtonog soja *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus agalactiae*, uzeto je 20 uzoraka mleka od pet krava, za ispitivanje prisustva *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus agalactiae*. Zdravstveno stanje krava i vimena ispitano je metodom opšteg kliničkog pregleda. Godišnja kontrola subkliničkih mastitisa pokazala je da su krave u prethodnoj laktaciji bile inficirane bakterijama *S. aureus* i *Str. agalactiae*. Pre uzimanja uzoraka, vime je obrisano krpom, dobro natopljenom i iscedenom u dezinficijnesu. Čišćenje i dezinfekcija vrhova sisa i otvora sisnog kanala vršena je tako da je palcem i savijenim kažiprstom leve ruke prihvatana sisa blizu vrha, stezana i povlačena da bi isteklo nekoliko kapi mleka u tankom mlazu, a zatim je vrh sise brisan sa tamponom vate, natopljenim 96% alkoholom. Dezinfekcija je vršena metodom "ka sebi" dok je uzimanje uzorka vršeno metodom "od sebe". Epruvete su postavljene gotovo u horizontalni položaj i iz svake četvrti izmuzano je nekoliko mililitara mleka. Uzorci mleka su u ručnom frižideru dopremani u laboratoriju.

4.1.2. Izolovanje i identifikovanje vakcinalnog soja *Staphylococcus aureus*

Od izolovanih i identifikovanih autohtonih sojeva *S. aureus* (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7), na osnovu biohemijskih karakteristika, izdvojen je izolat *S. aureus* SAU 7, za pripremu vakcine. Ovaj patogeni mikroorganizam ne zahteva specifične podloge za rast. Raste na krvnom agaru sa dodatkom 5-10% krvi, obrazuje pravilne, okrugle kolonije, blago ispupčene. Pored pravilnih S formi, mogu se zapaziti i R i G kolonije. Kolonije su pigmentirane u većini slučajeva zlatno-žutim pigmentom, ali neki sojevi mogu da poseduju i beli pigment (Marković, 1990; Quinn, 2002). Kolonije su veličine 3-5 mm sa jasnom zonom dvostruke alfa i beta hemolize i njihova identifikacija je potvrđena sledećim biohemijskim nizom.

4.1.2.1 Dokazivanje koagulaze

Koagulaza je dokazivana plazmom kunića, dobijenom dodavanjem 1 ml 10% natrijum citrata na 10 ml krvi. Posle centrifugovanja odvojen je bistar sloj iznad istaloženih eritrocita, koji je predstavljao plazmu kunića. Za dokazivanje koagulaze, plazma se razblaži fiziološkim rastvorom u odnosu 1:5. Od toga se uzme 0,5 ml i sipa u epruvetu, a zatim se bakteriološkom ezom doda delić kolonije koja se ispituje, posle čega se epruveta stavi u termostat na 37°C. Posle dva časa kontroliše se da li je nastupila koagulacija plazme. U slučaju da nije, inkubiranje se produžava za 4, 6 ili 24h.

4.1.2.2 Dokazivanje DNA-aze

Za dokazivanje DNA-aze aktivna bujonska kultura stafilokoka se podeli na dva dela i jedan se deo inaktiviše 15 minuta na 100°C. Tako pripremljena kultura se zasejava na baznu podlogu, sledećeg sastava:

DNA	0,3 g
NaCl	10 g
Agar	10 g
Tris pufer	100 ml koji se sastoji od:
Tris	0,05 mol/l
HCl	0,05 mol/l
Kalcijum hlorid	0,005 mol/l

Agar, DNA i NaCl se suspenduju u tris puferu i kuvaju dok se agar i DNA ne rastvore. U ohlađen agar do 45°C se doda 3 ml toluidin plavog. Na podlozi razlivenoj u Petrijeve šolje pripremljeni su bazenčići prečnika 2 mm. Inaktivirana i živa kultura zasejana je u dva susedna bazenčića. Zasejana podloga inkubirana je 4h na 37°C. Pojava ružičaste boje oko kolonija označavala je pozitivnu reakciju, a nastaje kao posledica razlaganja DNA pod dejstvom enzima DNA-aze.

4.1.2.3 Dokazivanje alkalne fosfataze

Za dokazivanje alkalne fosfataze korišćena je specifična podloga Baird Parker (Merck), koja se sastoji iz neutralnog bujona ili agara sa dodatkom 0,01% fenolftalein difosfata. Zasejane kolonije inkubirane su 18h na 37°C. Oslobođanje fenolftaleina, biofosfataza pozitivnih stafilokoka, potvrđeno je dodavanjem 2-3 kapi reagensa

amonijum hidroksida. Petrijeva šolja sa čvrstom podlogom i zasejanom ispitivanom kulturom je postavljena iznad otvorene boce sa amonijum hidroksidom, i kod fosfataza pozitivnih kultura, dobijala se crveno-ljubičasta boja.

4.1.2.4 Dokazivanje ureaze

Aktivnost ureaze ispitivana je na Cristensen-ovoj podlozi (Torlak) u koju se dodaje nekoliko kapi 20% rastvora ureje. Posle 24h inkubiranja kod pozitivne reakcije podloga dobija roze boju.

4.1.2.5 Fermentacija manitola

Fermentacija manitola ispitivana je na Manitol salt phenol red agaru (Merck), zasejavanjem ispitivane kulture 24h na 37°C. Pozitivna reakcija fermentacije manitola se ogledala u rastu kolonija sa jasnom prosvetljenom žutom zonom oko svog rasta.

4.1.2.6 Proba katalaze

Proba katalaze je izvođena na mikroskopskoj pločici suspendovanjem nekoliko izraslih kolonija u 3% vodenom rastvoru vodonik peroksida. Pozitivna reakcija je procenjivana pojavom mehurića gasa.

4.1.2.7 Oksidativno-fermentativni test

Ovaj test se koristi da bi se diferencirale stafilokoke, koje imaju fermentativni tip metabolizma, od mikrokoaka, koje imaju oksidativni tip metabolizma.

Reakcija se izvodi na Hugh-Leifson podlozi, koja je sledećeg sastava:

Pepton Trypticase (Difco)	2 g
NaCl	5 g
K ₂ HPO ₄	0,3 g
Agar-agar	3 g
Destilovana voda	ad 1.000 ml

U 1.000 ml destilovane vode rastope se svi navedeni sastojci, pH se podesi na 7,1 i doda se 15ml 0,2% rastvora indikatora bromtimol plavog, posle čega se po 8-10 ml podloge razliva u epruvete. Pre upotrebe podloga se kuva 10 minuta da bi se oslobodila kiseonika. Kultura se zasejava ubodom do dna epruvete i to dve epruvete jednim sojem.

Jedna epruveta zalije se sterilnim parafinom, do 2 cm iznad podloge, čime se postiže anaerobna sredina, a druga epruveta je ostavljena sa aerobnom sredinom. Epruvete se inkubiraju tokom 24h pri temperaturi 37°C. Bakterije (mikrokoke) koje imaju oksidativni metabolizam, zakisele podlogu samo u aerobnoj sredini i menjaju boju indikatora iz plave u žutu, dok one sa fermentativnim metabolizmom zakisele podlogu i promene boju duž čitavog stuba.

4.1.2.8 Osetljivost rasta mikroorganizama na novobiocin i polymyxin B

Osetljivost rasta mikroorganizama na novobiocin i polymyxin B je ispitivana na krvnom agaru sa upotrebom diskova ovih antibiotika. Posle inkubiranja tokom 24h pri temperaturi od 37°C, očitavana je osetljivost bakterije *S. aureus* na date antibiotike.

4.1.2.9 Dokazivanje hemolize

Za ispitivanje hemolizina stafilokoka korišćen je 5% krvni agar. Posle 18-20 časova inkubiranja kolonija javlja se nepotpuna alfa hemoliza i potpuna beta hemoliza.

Krajnja identifikacija izolovanih sojeva *S. aureus* je potvrđena sa Microgen Staph ID, pod kodnim brojem 77772.

4.1.3. Izolovanje i identifikovanje vakcinalnog soja *Streptococcus agalactiae*

Uporedo sa izolovanjem *S. aureus*, kao uzročnika pojavljivanja subkliničkih i kliničkih mastitisa, pre i u toku ogleda, ispitivano je prisustvo i *Streptococcus agalactiae*, kao mogućeg uzročnika ovih mastitisa. Izolovano je i identifikovano ukupno tri soja *Str. agalactiae*, od kojih je SAG 3 upotrebljen za pripremu vakcine, jer je dao najjasniji CAMP fenomen. Posle bojenja po Gramu, sve kolonije na krvnom agaru koje su morfološki odgovarale izgledu streptokoka, ispitivane su na prisustvo katalaze i na CAMP fenomen.

4.1.3.1 CAMP test, test za identifikaciju streptokoka

Podloga koja se u ove svrhe koristila je krvni agar sa dodatkom gvožđe citrata i 0,1% eskulina. Eskulina i gvožđe citrat se dodaju pre sterilizacije osnovne podloge. Cilj dodavanja je da se jasno izdiferentuje *Str. agalactiae* od ostalih streptokoka.

Na sredinu ploče se zasejava poznati soj *S. aureusa*, a vertikalno na njega ispitivani sojevi streptokoka. Pojava potpune zone hemolize u vidu klina ili polumeseca u zoni nepotpune hemolize stafilokoka je znak pozitivnog CAMP testa. Rezultati su očitavani posle 24h inkubacije, u termostatu, na 37°C, prema sledećoj šemi (Schalm, 1971):

Mikroorganizam	CAMP test	Eskulin
<i>S. agalactiae</i>	+	-
<i>S. dysgalactiae</i>	-	-
<i>S. uberis</i>	-	+

Krajnja identifikacija izolovanih sojeva *Str. agalactiae* je potvrđena sa Microgen Strep ID, pod kodnim brojem 50533.

4.2. Priprema vakcine

Vakcina je pripremana od dva štalska soja, koja su pokazala jasne biohemijske osobine, a to su: *S. aureus* SAU 7 i *Str. agalactiae* SAG 3. Ovi autohtoni sojevi *S. aureus* SAU 7 i *Str. agalactiae* SAG 3 zasejani su na Brain-Heart Infusion (Serva), koji se sastoji od:

Calf brain infusion	12,5 g
Beef heart infusion	5 g
Pepton kasin C/GSX	10,g
Dekstroza	2 g
Disodium hidrogen fosfat	2,5 g
NaCl	5 g
Konačan pH iznosi	7,4

Podloga se rastvara u količini od 37 grama na 1.000 ml destilovane vode.

4.2.1. I deo vakcine

Pripremljena količina od 5 litara podloge Brain-Heart Infusion je zasejana izolovanim sojem *S. aureus* SAU 7. Zasejana podloga je inkubirana tokom 24h pri temperturi od 37°C. Posle inkubiranja u podlogu je dodato 0,4% vol/vol formalina i ponovo inkubirano 24h. Posle inaktivisanja mikroorganizma formalinom, kultura u navedenoj podlozi je centrifugirana na 7.000 rpm, 20 minuta, na 4°C. Inaktivacija mikroorganizma proverena je tako što je kultura zasejana na krvni agar i inkubirana tokom 24h pri temperturi od 37°C. Izostajanje rasta i hemolize na krvnom agaru govorilo je da je kultura inaktivisana. Nakon centrifugiranja supernatant je odliven, a talog resuspendovan u 0,9% NaCl pH 7,0. Resuspendovani talog predstavljao je prvi deo vakcine.

4.2.2. II deo vakcine

Sledeći korak bila je priprema drugog dela vakcine koji se sastoji od inaktivisanog soja *Str. agalactiae* SAG 3. Pripremljena količina od 5 litara podloge Brain-Heart Infusion je zasejana izolovanim sojem *Str. agalactiae* SAG 3. Zasejana podloga je inkubirana tokom 24h pri temperturi od 37°C. Posle inkubiranja, u podlogu je dodato 0,4% vol/vol formalina i ponovo inkubirano 24h. Posle inaktivisanja mikroorganizma formalinom, kultura u navedenoj podlozi je centrifugirana na 7.000 rpm, 20 minuta, na 4°C. Inaktivacija mikroorganizma proverena je tako što je kultura zasejana na krvni agar i inkubirana tokom 24h pri temperaturi od 37°C. Izostajanje rasta i hemolize na krvnom agaru ukazivalo je da je kultura inaktivisana. Nakon centrifugiranja supernatant je odliven, a talog resuspendovan u 0,9% NaCl pH 7,0. Resuspendovani talog predstavljao je drugi deo vakcine.

U resuspendovani talog je dodato 0,4% vol/vol formalina, 0,001% wt/vol konzervansa tiomerozal i aluminijum hidroksida, kao nosača, u koncentraciji od 3,5% wt/vol. Doza vakcine je iznosila 5 ml po kravi i sastojala se od inaktivisanih bakterijskih ćelija *S. aureus* SAU 7 u količini od 1×10^{10} cfu/ml (I deo vakcine) i *Str. agalactiae* SAG 3 u količini od 4×10^9 cfu/ml (II deo vakcine). Na ovaj način, od pripremljene vakcine dobijena je 151 doza, od po 5 ml.

4.2.3. Ispitivanje vakcine na sterilnost i netoksičnost

Sterilnost. Vakcina je zasejana u 2 epruvete serum bujona, 2 epruvete sa hranljivim bujonom, Jansenov-om bujonu uz dodatak skroba, Jansenov-om bujonu sa dodatkom glukoze, hranljivom kosom agaru (2 epruvete) i u krvnom agaru. Ni u jednoj od navedenih podloga nije ustanovljen rast aerobnih i anaerobnih mikroorganizama, što je potvrda da je vakcina sterilna.

Netoksičnost. Netoksičnost je ispitana na 10 belih miševa, dva zamorca, četiri ovce i četiri gravidne krave. Vakcina u dozi od 1 ml aplikovana je na dva načina, grupama od po 5 miševa, intraperitonealno i subkutano. Svi miševi su preživeli ogled uz nepromenjeno ponašanje, bez temperature i sa očuvanim apetitom. Posle obdukcije nisu nađene promene na mestu intraperitonealne aplikacije vakcine, niti je bilo žarišta na parenhimatoznim organima. Miševi koji su dobili vakcinu subkutano, takođe su svi prošli kroz ogled bez vidljivih promena ponašanja i načina ishrane, samo su posle obdukcije na mestu aplikacije vakcine primećeni manji čvorići. Ispitivanje toksičnosti na zamorcima nije ukazivalo na toksičnost vakcine. Ovce koje su dobile vakcinu nisu pokazale porast telesne temperature, koja je u proseku iznosila 39,4°C, niti promene opšteg zdravstvenog stanja. Vakcina u dozi od 5 ml aplikovana je subkutano u regiju vrata gravidnim kravama (četiri krave) dva meseca pred teljenje. Kod svih krava nije bilo promena u ponašanju, uzimanju hrane, preživanju i temperaturi. Na mestu aplikacije vakcine 10-20 dana zadržao se čvorić veličine lešnika, koji se kasnije resorbovao.

Na osnovu ovih ispitivanja odlučeno je da se vakcina aplikuje u dva dela, po 2,5 ml subkutano sa svake strane vrata u brahijalnu regiju.

4.3. Citološka ispitivanja uzoraka mleka

Broj somatskih ćelija ispitivan je svetlosnom mikroskopijom. Od svih uzoraka mleka pripremljeni su citološki preparati na sledeći način: na mikroskopsku pločicu sipano je 0,01 ml mleka i razliveno na površinu od 1 cm². Da bi se ovo postiglo korišćeni su odgovarajući kartoni ispod mikroskopske pločice, sa ucrtanim kvadratom veličine 1 cm². Kada je preparat osušen (najmanje 24h) vršeno je obezmašćivanje 5 minuta ksilolom, zatim sušenje i fiksiranje etanolom u trajanju od 5 minuta, i nakon sušenja obavljano je bojenje ranije pripremljenom bojom.

Boja je pripremljena na sledeći način:

- 375 ml etil alkohola, 130 ml destilovane vode i 3 g metilenskog plavog se kuva dok se boja potpuno ne rastvori, a zatim se filtrira kroz filter papir. U rastvor se zatim dodaju dva rastvora, A i B:
- Rastvor A, 10 g bazičnog fuksina se rastvori u 100 ml etilalkohola i pre upotrebe se filtrira kroz filter papir;
- Rastvor B, 10 ml anilina.

Svi rastvori se pomešaju, blago zagreju, a zatim im se doda 25 ml 10% H₂SO₄ i 300 ml vrele destilovane vode, ponovo zagreje 1 minut i na kraju filtrira. Ovako pripremljena boja koristi se za citološko bojenje ćelija iz mleka.

Broj somatskih ćelija se izračunava preko formule koja određuje faktor mikroskopa (FM) i broja izbrojanih ćelija u jednom vidnom polju (pregleda se pet vidnih polja i izračunava srednja vrednost broja izbrojanih ćelija):

$$FM = 100/r^2 \pi \times n$$

gde je: FM - faktor mikroskopa; r - prečnik kruga; $\pi=3,14$; x – broj vidnih polja; n - prosečan broj izbrojanih leukocita.

4.4. Imunološka ispitivanja

Zbog nedostatka komercijalnih ELISA testova, za potrebe eksperimenta samostalno su dizajnirani ELISA testovi, pomoću kojih je određivan nivo specifičnih antitela u mleku. U daljem tekstu opisan je način pripreme ovih testova.

4.4.1 Priprema ploča za indirektan ELISA test

4.4.1.1. Priprema antigena

Vakcinalni sojevi *Staphylococcus aureus* SAU 7, kao i *Streptococcus agalactiae* SAG 3, inokulisani su u po 10 ml moždano-srčanog bujona – BHI bujon (Oxoid, UK) i inkubirani na temperaturi od 37°C, tokom 24 časa. Nakon inkubiranja, 2 ml bujonske kulture je centrifugovano na 6000 o/min, tokom 10 minuta. Supernatant je odbačen, a ćelijski sediment je resuspendovan u 2 ml fosfatno-slanog pufera pH 7,4 – PBS (Oxoid,

UK). Suspenzije su, potom, ponovo centrifugovane na 6000 o/min tokom 10 minuta, a supernatant je odbačen. Postupak je ponovljen još 2 puta.

Dobijeni sedimenti su resuspendovani u 5 ml $\frac{1}{4}$ Ringer rastvora (Oxoid, UK), uz dodatak 2% Lysosima (Merck, Nemačka), 89 mM TRIS (Merck, Nemačka) i 2 mM EDTA (Merck, Nemačka). Rastvori su inkubirani pri temperaturi od 56°C tokom 30 minuta. Nakon inkubacije, rastvor je dobro izmešan na vortex mešalici, i u njega je dodat 0,3% formaldehid (Merck, Nemačka). Suspenzije su inkubirane na 4°C, tokom 24 časa.

Nakon inkubiranja, suspenzije su zagrevane u termobloku (Techne, Nemačka), na temperaturi od 100°C, tokom 30 minuta. Potom su suspenzije centrifugovane na 6000 o/min, tokom 10 minuta i prikupljen je supernatant (koji sadrži antigene).

Suspenzije su potom dva puta isprane u PBS puferu, da bi se pročitile od stranih proteina i produkata metabolizma iz samog bujona. Sastav pufera je takav da ne uzrokuje pucanje ćelijskog zida i kontaminaciju citoplazmatskim sadržajem, dok se ne obezbede ostali uslovi za kidanje fragmenata zida. Dodavan je lizozim koji kida beta 1-4 vezu između N-acetil muraminske kiseline i N-acetil glukozamina. Korišćenjem enzima stvaraju se mali fragmenti, dobrih osobina antigenosti, koji se ne deformišu lako. Ostale komponente obezbeđuju povoljne puferske uslove, kao i vezivanje kontaminirajućih katjona za polistiren.

4.4.1.2. Oslojavanje mikrotitar ploča (Coating)

Supernatant sa antigenima razblažen je sa puferom za oslojavanje mikrotitar ploča (Coating buffer - 100 mM Na₂CO₃/NaHCO₃, pH 9,6, Sigma Aldrich, Nemačka) u odnosu 1:10. Po 100 µl „coating buffer“ pipetirano je u svaki bazenčić polistirenske mikrotitar ploče (Nunc, Danska). S obzirom da je polistiren loš provodnik toplote, oslojene ploče inkubirane su pri temperaturi od 4°C, tokom 24 časa. Nakon inkubacije, ploče su isprane 3 puta rastvorom za ispiranje (PBS pH 7,4).

Sile koje pasivno adsorbuju proteine na površinu polistirenskih mikrotitar ploča su po prirodi hidrofobne interakcije, van der Valsove sile, vodonikove veze i jonske interakcije (navedene su opadajućim redom). Svaka veza antigen-protein ostvarena ovim silama je 100-1000 puta slabija nego kovalentno ostvarena veza. Za dalji tok reakcije i stabilnost veza, neophodno je da svaki molekul ostvari više slabih veza sa

površinom plastike. Slabost ovih veza objašnjava pojavu da adsorbovani proteini (u našem slučaju antigeni vakcinalnih sojeva bakterija) mogu lako biti odstranjeni sa površine iste. Iz tog razloga u rastvoru za ispiranje u ovoj fazi ne smeju se naći deterdženti kao što su Triton X-100 ili Tween 20 jer su jako efiksani u kidanju hidrofobnih veza protein-plastika, pa bi na taj način uzrokovali desorpciju antigena i u kasnijem toku ispitivanja generisali lažno negativne rezultate.

4.4.1.3. Blokiranje mikrotitar ploča (Blocking)

U svaki od bazenčića pipetirano je po 200 µl rastvora za blokiranje (Blocking buffer – 3% kazein hidrolizat/PBS, Oxoid, UK). Blokiranje ploče inkubirane su pri temperaturi od 4°C tokom 24 časa. Nakon inkubacije, ploče su isprane 3 puta rastvorom za ispiranje (PBS pH 7,4).

Oslojavanje bazenčića mikrotitar ploče specifičnim antigenom ostavlja pojedina hidrofobna mesta u plastici slobodnim. To bi u kasnijem toku rada uzrokovalo vezivanje nespecifičnih reaktanata i dovelo do lažnih rezultata. Zbog toga ova mesta moraju biti blokirana. Blokiranje se ostvaruje korišćenjem ili proteina ili deterdženata. U izvedenom eksperimentu proteini (goveđi serumski albumin, obrano mleko u prahu, kazein/kazeinat, riblji želatin) su se pokazali kao mnogo efektivnije i jeftinije rešenje. Isprobani su svi navedeni proteini, pri čemu se kazeinat (obično od 1-5%) pokazao kao najbolje rešenje.

4.4.2. Radni protokol za indirektan ELISA test

4.4.2.1. Priprema uzoraka

Uzorci punog mleka su odmrznuti i homogenizovani na vortex mešalici. Po 2 ml svakog uzorka je pipetirano u odgovarajuću kivetu (Eppendorf, Nemačka), a zatim su centrifugovani na 6000 o/min, tokom 10 minuta. Po 1 ml supernatanta (mlečni serum) je pipetirano u novu kivetu i čuvano pri temperaturi od 4°C, do početka rada.

4.4.2.2. Inokulacija uzoraka

U svaki bunarčić mikrotitar ploče pipetirano je po 50 µl homogenizovanog uzorka mlečnog seruma. Nakon inokulacije, ploča je inkubirana pri sobnoj temperaturi tokom 20 minuta.

U ovoj fazi se antitela sintetisana pod uticajem vakcinalnog soja vezuju za epitope antigena adsorbovanih na polistirensku ploču.

4.4.2.3. Adicija konjugata

Nakon inkubacije, ploča je isprana 3 puta rastvorom pufera sa deterdžentom (TRIS Buffered Saline + 0,2% Triton X-100). Potom je u svaki bunarčić mikrotitar ploče pipetirano po 50 µl konjugata (kozija-antigoveđa IgG antitela obeležena peroksidazom rastvorena u stabilizatoru u odnosu 1:2500, KPL, USA). Nakon adicije konjugata, ploča je inkubirana na sobnoj temperaturi, tokom 20 minuta.

U ovoj fazi kozija antitela konjugovana sa peroksidazom vezuju se za Fc fragment govedih antistafilokoknih, odnosno antistreptokoknih antitela, prethodno vezanih za antigen *S. aureus*, odnosno *Str. agalactiae*.

4.4.2.4. Adicija supstrata

Nakon inkubacije, ploča je isprana 3 puta rastvorom pufera sa deterdžentom (TRIS Buffered Saline + 0,2% Triton X-100). Potom je u svaki bunarčić mikrotitar ploče pipetirano po 50 µl supstrata (SureBlue/TMB, KPL, USA). Nakon adicije supstrata, ploča je inkubirana na sobnoj temperaturi, tokom 20 minuta.

U ovoj fazi peroksidaza razlaže 3,5,3',5' tetrametilbenzidin (TMB) i stvara plavo obojeni proizvod, koji u tom trenutku ima apsorbanču od 650 nm.

4.4.2.5. Adicija stop rastvora i merenje apsorbance

Nakon inkubacije, u svaki bunarčić mikrotitar ploče pipetirano je po 50 µl stop rastvora (1N H₂SO₄, Sigma Aldrich, Nemačka). Nakon adicije stop rastvora i zaustavljanja dalje reakcije, izmerena je apsorbanča svakog uzorka, pomoću spektrofotometra (Ascent, Thermo Science, UK), pri 450 nm.

U ovoj fazi plavo obojeni proizvod acidifikuje se sumpornom kiselinom, blokira se dalji razvoj boje, a novonastala žuta boja u tom trenutku ima apsorbanču od 450 nm.

Korišćeni sistem za detekciju antitela imao je limit detekcije od 0,1 do 0,3 ng/ml imunglobulina HRP-IgG, dakle manje od jednog milijarditog dela. Isti ovakav protokol je korišćen za pripremu ELISA testa za ispitivanje specifičnih streptokoknih antitela.

4.4.2.6. Određivanje cut-off vrednosti indirektnog ELISA testa

Za određivanje „cut-off“ vrednosti indirektnog ELISA testa za detekciju antistafilokoknih (*Staphylococcus aureus*), odnosno antistreptokoknih (*Streptococcus agalactiae*) antitela korišćen je komercijalni mlečni serum slobodan od goveđih antistafilokoknih i antistreptokoknih antitela (VMRD-Veterinary Medical Research and Diagnostics Inc, USA), koji je predstavljao negativnu kontrolu. Za izračunavanje „cut-off“ vrednosti korišćen je modifikovani algoritam prema Frey i sar. (1998).

U svaki od 20 bunarčića ELISA polistirenskih ploča oslojenih antigenom *Staphylococcus aureus* odnosno *Streptococcus agalactiae*, pipetirano je po 50 µL negativne kontrole. Uzorci su ispitivani prema napred navedenom protokolu i blankovani na vazduh. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 1.

Tabela 1. Izračunate "cut-off" vrednosti

REDNI BROJ UZORKA	IZMERENE OD VREDNOSTI ANTISTAFILOKOKNI ELISA TEST	IZMERENE OD VREDNOSTI ANTISTREPTOKOKNI ELISA TEST
1.	0,168	0,137
2.	0,151	0,113
3.	0,139	0,192
4.	0,161	0,124
5.	0,126	0,193
6.	0,150	0,158
7.	0,093	0,117
8.	0,130	0,140
9.	0,135	0,137
10.	0,098	0,105
11.	0,102	0,151
12.	0,178	0,109
13.	0,127	0,196
14.	0,128	0,124
15.	0,149	0,160
16.	0,134	0,161
17.	0,090	0,158
18.	0,128	0,103
19.	0,106	0,103
20.	0,087	0,141
SR. VR. ± SD	0,129 ± 0,025	0,141 ± 0,031
CUT-OFF VREDNOST	0,219	0,247

„Cut-off“ vrednost izračunata je prema sledećoj formuli:

$$\text{CUT-OFF} = \text{SREDNJA VREDNOST OD (NEG. KONTROLE 1-20)} + 3 \times \text{SD} + 10\%$$

Implementacijom gore navedene formule izračunato je da je „cut-off“ vrednost za antistafilokokni ELISA test iznosila 0,219 OD, odnosno da je za antistreptokokni ELISA test iznosila 0,247 OD. U ogledu su sve vrednosti iznad „cut-off“ vrednosti smatrane potencijalno pozitivnim, dok su vrednosti ispod „cut-off“ vrednosti smatrane sigurno negativnim.

4.5. Eksperimentalni dizajn

U ogled je uključeno 60 gravidnih, muznih krava holštajn-frizijske rase, približne starosti (4-5 godina). Eksperimentalnu grupu 1 (E 1) činilo je dvadeset krava, koje su vakcinisane dva meseca pred teljenje, a revakcinisane mesec dana pred očekivani termin teljenja. Eksperimentalna grupa 2 (E 2) se sastojala od dvadeset krava, koje su vakcinisane mesec dana pred očekivani termin teljenja, a revakcinisane dva meseca posle teljenja. Preostalih 20 krava predstavljalo je kontrolnu grupu (K), kojima je data placebo vakcina, dva, odnosno jedan mesec pred partus (5ml sterilnog fiziološkog rastvora) (Tabela 2).

Od svih životinja uzimani su uzorci mleka pre vakcinisanja (pre zasušenja), a zatim posle teljenja, u intervalu od po mesec dana, do pojave prvih simptoma kliničkih i subkliničkih mastitisa. Uzeti uzorci mleka su ispitani citološki i bakteriološki radi otkrivanja prisustva *S. aureus* i *Str. agalactiae*.

Tabela 2. Dizajn eksperimenta

<i>Grupe</i>	<i>Broj životinja</i>	<i>Vakcinacija</i>	<i>Revakcinacija</i>	<i>Prvo uzimanje uzoraka mleka</i>	<i>Teljenje, uzimanje uzoraka mleka</i>
Kontrolna grupa K	20	dva meseca pred partus-placebo	jedan mesec pred partus-placebo	pre zasušenja	na mesec dana
Eksperimen. grupa E1	20	dva meseca pred partus	jedan mesec pred partus	pre zasušenja	na mesec dana
Eksperimen. grupa E2	20	mesec dana pred partus	dva meseca posle partusa	pre zasušenja	na mesec dana

4.6. Ispitivanje broja somatskih ćelija i antitela u mleku prvotelkinja

Na istoj farmi uzeto je mleko od 10 prvotelkinja, da bi se ispitaio broj somatskih ćelija, kao i koncentracija antitela u mleku na već opisani način.

4.7. Statistička obrada podataka

U statističkoj analizi dobijenih rezultata izvedenog eksperimenta, kao osnovne statističke metode korišćeni su sledeći deskriptivni statistički parametri: aritmetička sredina, standardna devijacija, standardna greška aritmetičke sredine, interval varijacije i koeficijent varijacije. Prilikom testiranja i utvrđivanja statistički značajnih razlika između ispitivanih eksperimentalnih grupa korišćena su dva testa. Prvi test, potpuno slučajan plan (ANOVA), je grupni test na osnovu koga je ustanovljavano postojanje signifikantnih razlika između posmatranih tretmana ukupno. Drugi test koji je korišćen je pojedinačni, Tukey test, pomoću koga su ustanovljavane statistički signifikantne razlike između tretmana pojedinačno. Značajnost razlika ustanovljavana je na nivoima značajnosti od 5% i 1%, pa su prema tome i zaključci dati sa odgovarajućom verovatnoćom (95% i 99%). Svi dobijeni rezultati prikazani su tabelarno i grafički. Statistička analiza dobijenih rezultata urađena je u statističkom paketu PrismaPad 4.00 i MS Excel.

5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

U ovom poglavlju prikazani su rezultati ogleda na farmi krava sa visokim godišnjim procentom subkliničih i kliničkih mastitisa, gde je primenjeno dvokratno vakcinisanje vakcinom koja je pripremljena od autohtonog izolata *S. aureus* SAU 7 i *Str. agalactiae* SAG 3.

Zbog bolje preglednosti, rezultati su prikazani u vidu tabela i grafikona za odgovarajuće ispitivane parametre.

5.1. Rezultati praćenja opšteg zdravstvenog stanja vakcinisanih krava

Ogled je izveden na 60 visoko gravidnih krava holštajn-frizijske rase. U kontrolnoj, eksperimentalnoj grupi 1 i eksperimentalnoj grupi 2 u početku eksperimenta bilo je po 20 krava. Nekoliko dana posle teljenja, četiri krave sa dijagnozom puerperalne pareze poslate su na prinudno klanje. Devet krava tokom ogleda je isključeno zbog abortusa, ketoze, povreda i drugih organskih oboljenja. Dve krave su isključene iz ogleda zbog teških oboljenja i trauma pred kraj ogleda. Na kraju eksperimenta ostalo je po 15 krava u kontrolnoj, i po 15 u dve eksperimentalne grupe.

Ispitivanje vakcine na neškodljivost, apirogenost i toksičnost, vršeno je subkutanom aplikacijom vakcine gravidnim kravama, nakon čega je primećena pojava blagog otoka na mestu aplikacije vakcine. Otok je nestajao najkasnije do tri nedelje posle inokulisanja vakcine. Da bi se smanjila mogućnost pojave otoka, koji je posledica reakcije organizma na nosač - aluminijum hidroksid, količina vakcine od 5 ml podeljena je na dva jednaka dela i tako aplikovana gravidnim životinjama. Životinje koje su bile vakcinisane nisu pokazivale promenu opšteg stanja, niti su imale povećanu telesnu temperaturu. Dužina graviditeta oglednih krava iznosila je 275 ± 5 , a kontrolnih 278 ± 4 dana. Zaostajanje posteljice primećeno je kod tri krave iz kontrolne grupe i po dve u svakoj oglednoj grupi.

5.2. Rezultati mikrobioloških ispitivanja mleka u vakcinisanim grupama i kontrolnoj grupi krava obolelih od kliničkih i subkliničkih mastitisa

Mikrobiološko ispitivanje mleka krava obe grupe, vršeno je neposredno pre zasušenja, odnosno pre početka oglada - vakcinisanja, a zatim svakih mesec dana posle teljenja, do pojave kliničkih ili subkliničkih mastitisa, izazvanih bakterijama *S. aureus* i *Str. agalactiae*. Eksperiment je trajao 8 meseci, i to od zasušenja krava, do pojave prvih kliničkih ili subkliničkih mastitisa izazvanih bakterijama *S. aureus* i *Str. agalactiae*.

Iz mleka krava kontrolne (K) i eksperimentalne grupe 2 (E 2), na početku oglada izolovan je *S. aureus* kod 6 krava (40%), a u eksperimentalnoj grupi 1 (E 1) kod 8 krava (53,3%). Na kraju oglada *S. aureus* je izolovan najviše u kontrolnoj grupi (K), i to kod 8 jedinki (53,3%), dok je u eksperimentalnoj grupi 1 (E 1) izolovan kod 4 (26,6), a u eksperimentalnoj grupi 2 (E 2) kod 3 krave (20%). Subklinički mastitisi su dijagnostikovani kod 6 krava iz kontrolne grupe (40%), zatim kod 4 krave (26,6%) iz eksperimentalne grupe 1, i kod 3 krave (20%) iz eksperimentalne grupe 2. Klinički mastitisi izazvani *S. aureus*-om javili su se samo kod kontrolne grupe krava u dva slučaja (13,3%). Kod krava iz obe eksperimentalne grupe nisu dijagnostikovani klinički mastitisi (tabela 3).

Tabela 3. Pojava kliničkih i subkliničkih mastitisa izazvanih *S.aureus*-om na početku i na kraju oglada ispitivanih grupa

Grupe	Broj krava	<i>S. aureus</i> na početku	%	<i>S. aureus</i> na kraju	%	Subklinički mastitisi	%	Klinički mastitisi	%
K	15	6	40	8	53,3	6	40	2	13,3
E1	15	8	53	4	26,6	4	26,6	/	/
E2	15	6	40	3	20	3	20	/	/

Na početku oglada iz mleka kontrolne i eksperimentalnih grupa 1 i 2, *Str. agalactiae* je izolovan kod 3 (20%) krave u svakoj grupi. Na kraju oglada *Str. agalactiae* je izolovan samo kod dve krave (13,3%) iz kontrolne grupe, dok kod eksperimentalnih grupa ovaj mikroorganizam nije izolovan. Subklinički mastitisi izazvani bakterijom *Str. agalactiae* dijagnostikovani su samo kod dve krave iz kontrolne grupe, dok ovaj prouzrokovatelj nije izolovan u mleku krava iz eksperimentalnih grupa. S

druge strane, klinički mastitisi izazvani ovim mikroorganizmom nisu dijagnostikovani ni kod jedne krave u eksperimentu (tabela 4).

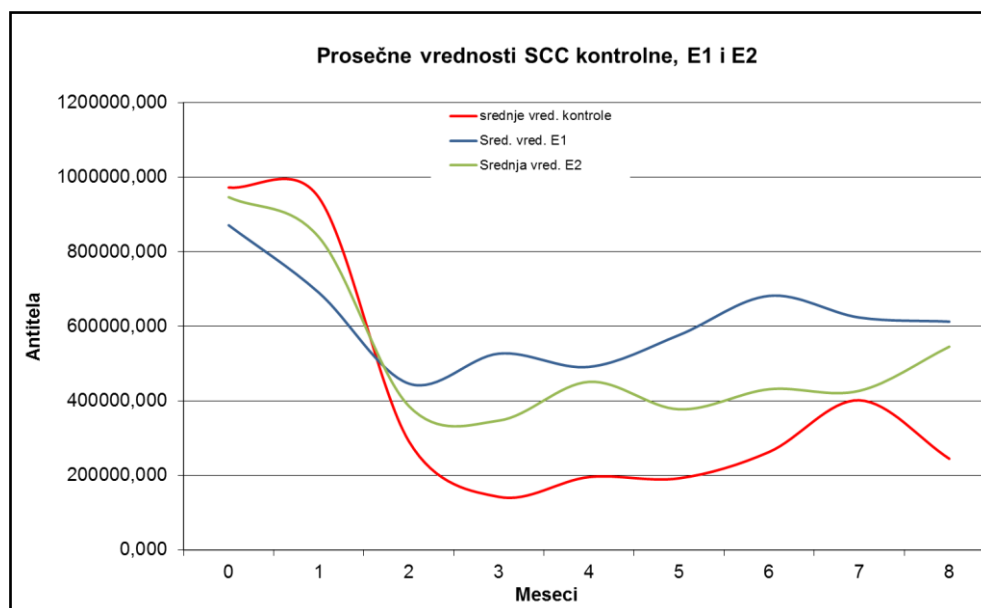
Tabela 4. Pojava kliničkih i subkliničkih mastitisa izazvanih bakterijom *S.agalactiae* na početku i na kraju ogleda ispitivanih grupa

Grupe	Broj krava	<i>S. agalactiae</i> na početku	%	<i>S. agalactiae</i> na kraju	%	Subklinički mastitisi	%	Klinički mastitisi	%
K	15	3	20	2	13,3	2	13,3	/	/
E1	15	3	20	/	/	/	/	/	/
E2	15	3	20	/	/	/	/	/	/

5.3. Rezultati broja somatskih ćelija u mleku oglednih grupa krava

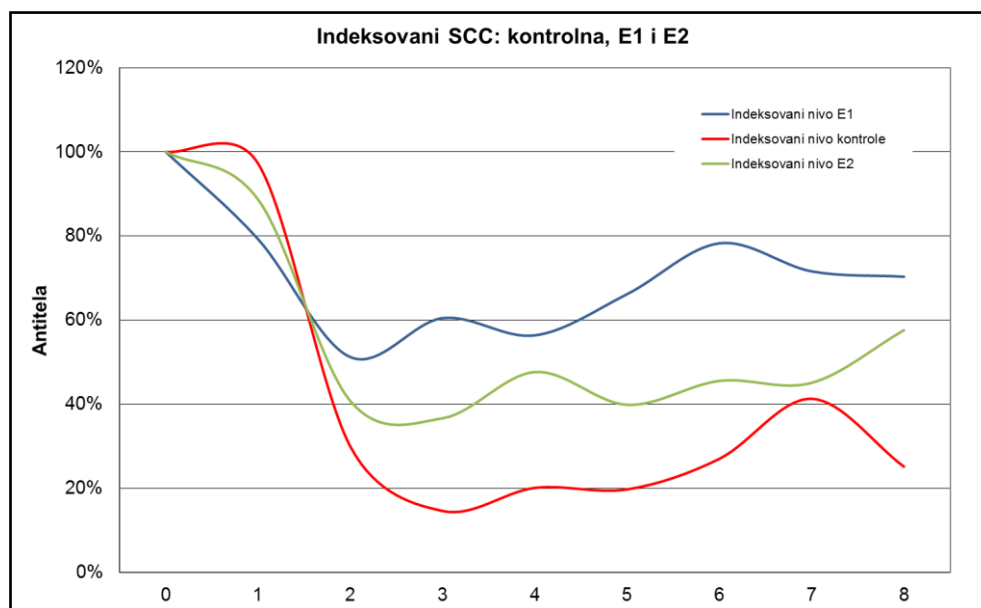
Broj somatskih ćelija (SCC) u 1ml mleka je određivan mikroskopskim brojanjem ćelija, pomoću metode koja je ranije opisana. Prosečna vrednost SCC u 1 ml mleka dobijenih od krava iz kontrolne grupe (K) iznosila je 405.215 ± 41.893 , dok je ta vrednost u eksperimentalnoj grupi 1 (E 1) iznosila 613.204 ± 38.123 , a u eksperimentalnoj grupi 2 (E 2) 527.681 ± 42.617 . Nije bilo statističke značajnosti u SCC tokom celog perioda. Kod kontrolne grupe krava, na početku zasušenja SCC iznosio je 972.409 ± 178.844 u 1ml mleka, dok je kod eksperimentalne grupe 1 SCC bio 871.011 ± 122.639 , a u eksperimentalnoj grupi 2 iznosio je 946.320 ± 124.567 u 1 ml mleka. U izvedenom eksperimentu, prosečan broj somatskih ćelija u mleku na početku laktacije (kolostrum) iznosio je kod kontrolne grupe 945.609 ± 170.027 u 1ml mleka, kod eksperimentalne grupe 1 je bio 690.317 ± 114.126 , a kod eksperimentalne grupe 2 broj SCC je iznosio 939.356 ± 114.175 u 1 ml mleka.

Iz grafikona 1 se vidi da je u prvom mesecu ogleda prosečan SCC u 1 ml mleka bio veći kod kontrolne grupe, nego kod eksperimentalnih grupa 1 i 2. Od drugog meseca, pa do kraja ogleda, prosečan SCC u 1ml mleka kod eksperimentalne grupe 1 veći je nego kod eksperimentalne grupe 2 i kontrolne grupe. Posle sedmog meseca, prosečan SCC u 1 ml mleka je bio niži kod kontrolne grupe 401351 ± 104.104 , dok se kod eksperimentalnih grupa 1 i 2 zadržao na 623.507 ± 92.569 , odnosno 626.555 ± 113.386 u 1 ml mleka.



Grafikon 1. Prosečne vrednosti broja somatskih ćelija u 1ml mleka kod oglednih grupa

Iz grafikona 2 može da se uoči da od drugog meseca SCC u 1 ml mleka kod kontrolne i kod obe eksperimentalne grupe je sa početne vrednosti pao na 60%. Od trećeg meseca procenat SCC kod eksperimentalne grupe 1 je sa 100% pao na 60% od početne vrednosti, i na toj vrednosti se zadržao do petog meseca, kada počinje da raste i dostiže nivo od skoro 80%, da bi do kraja ogleda došlo do ponovnog pada na 65% prvobitne vrednosti. Broj somatskih ćelija kod eksperimentalne grupe 2 je sa 100% pao na 40% prvobitne vrednosti posle drugog meseca ogleda i na toj vrednosti se zadržao do sedmog meseca, kada je počeo da raste na skoro 60% od početne vrednosti. Indeksovane vrednosti SCC u 1 ml mleka kod kontrolne grupe, od drugog pa sve do šestog meseca, se zadržavaju na svega 20% od početne vrednosti, a od šestog meseca vrednost SCC ponovo raste do 40 %, da bi u sedmom mesecu dostigla nivo koji je iznosio 20% od početne vrednosti.



Grafikon 2. Indeksovani broj somatskih ćelija u 1 ml mleka kod oglednih grupa

5.4. Rezultati nivoa antistafilokoknih antitela u mleku

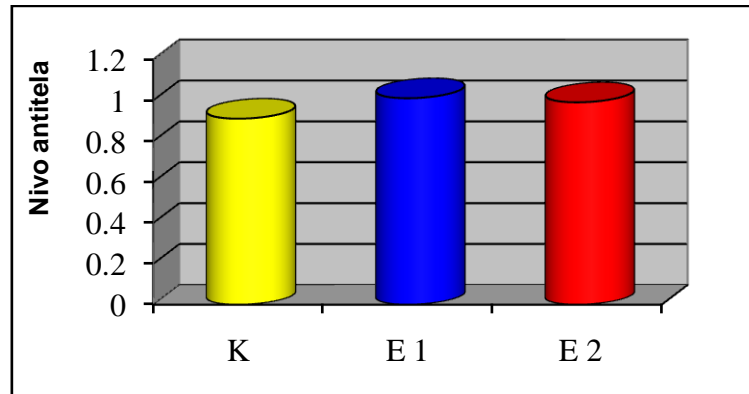
Nivo antitela protiv *S. aureus* ispitivan je pomoću ELISA testa, čija je priprema opisana u poglavlju materijal i metode rada.

Analizom dobijenih podataka nije ustanovljena statistički značajna razlika u nivou specifičnih antistafilokoknih antitela u mleku između grupa na početku ogleda (nultoga dana) ($p \geq 0,05$) (Grafikon 3). Srednja vrednost nivoa antistafilokoknih antitela bila je najveća kod eksperimentalne grupe 1 i iznosila je $1,01 \pm 0,24$ OD (optical density), kod eksperimentalne grupe 2 iznosila je $0,99 \pm 0,17$ OD, a najmanja vrednost nivoa antitela je bila kod kontrolne grupe, gde je iznosila $0,91 \pm 0,15$ OD (Tabela 5)

Tabela 5. Deskriptivni statistički parametri nivoa antistafilokoknih antitela u mleku nultog dana, pre početka ogleda

Grupe	\bar{X}	SD	Sx	Minimum	Maximum	CV%
K	0,91	0,15	0,0383	0,52	1,1	18,35
E 1	1,01	0,24	0,0609	0,59	1,30	23,26
E 2	0,99	0,17	0,0442	0,66	1,25	17,31

Istim slovima obeležena je signifikantna razlika. a, b, c $p \leq 0,05$; x, y, z $p \leq 0,01$



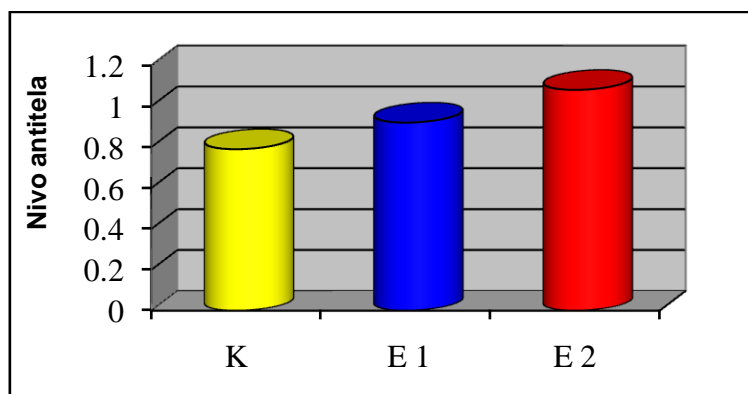
Grafikon 3. Prosečne vrednosti nivoa antistafilokoknih antitela u mleku ispitivanih krava nultog dana

Statističkom analizom ustanovljeno je da je srednja vrednost nivoa antistafilokoknih antitela u mleku 1. meseca (kolostrum), bila najveća kod eksperimentalne grupe 2, i iznosila je $1,08 \pm 0,17$ OD. Kod eksperimentalne grupe 1 ova vrednost je iznosila $0,92 \pm 0,18$ OD, dok je nivo antistafilokoknih antitela u mleku bio najmanji kod kontrolne grupe krava, gde je iznosio $0,79 \pm 0,25$ OD (Grafikon 4). Daljom analizom ustanovljena je značajno manja koncentracija antitela ($p \leq 0,05$) kod kontrolne grupe krava u odnosu eksperimentalnu grupu 2. Analizom nisu ustanovljene značajne razlike ($p \geq 0,05$) između kontrolne i eksperimentalne 1 grupe, kao ni između dve eksperimentalne grupe krava (Tabela 6).

Tabela 6. Deskriptivni statistički parametri nivoa antistafilokoknih antitela u mleku 1. meseca

Grupe	\bar{X}	SD	Sx	Minimum	Maximum	CV%
K	0,79 ^a	0,25	0,0634	0,19	1,08	30,96
E 1	0,92	0,18	0,0467	0,50	1,13	19,61
E 2	1,08 ^a	0,17	0,0426	0,69	1,32	15,34

Istim slovima obeležena je signifikantna razlika. a, b, c $p \leq 0,05$; x, y, z $p \leq 0,01$



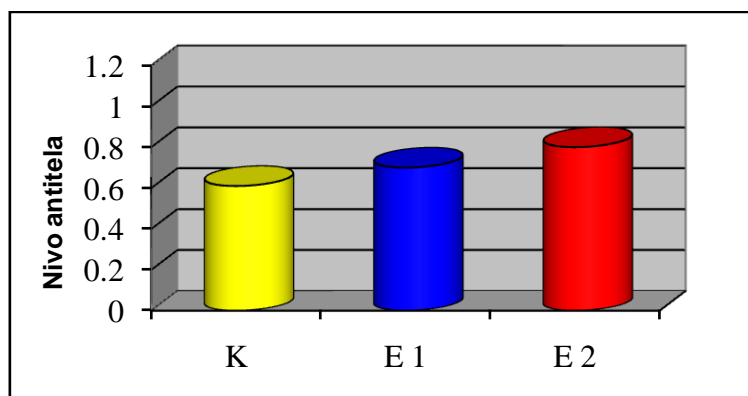
Grafikon 4. Prosečne vrednosti nivoa antistafilokoknih antitela u mleku ispitivanih krava 1. meseca

Statističkom analizom ustanovljeno je da je srednja vrednost nivoa antistafilokoknih antitela u mleku 2. meseca kod eksperimentalne grupe 2 bila najveća, i iznosila je $0,80 \pm 0,16$ OD. Kod eksperimentalne grupe 1 ova vrednost je iznosila $0,70 \pm 0,18$ OD, a najmanja vrednost nivoa antitela u mleku 2. meseca bila je kod kontrolne grupe krava, gde je iznosila $0,61 \pm 0,18$ OD (Grafikon 5). Daljom analizom ustanovljena je značajno manja koncentracija antitela ($p \leq 0,05$) kod kontrolne grupe krava u odnosu na eksperimentalnu grupu 2. Statističkom analizom nisu ustanovljene značajne razlike ($p \geq 0,05$) između kontrolne i eksperimentalne 1 grupe, kao ni između dve eksperimentalne grupe krava (Tabela 7).

Tabela 7. Deskriptivni statistički parametri nivoa antistafilokoknih antitela u mleku 2. meseca

Grupe	\bar{X}	SD	Sx	Minimum	Maximum	CV%
K	0,61 ^a	0,18	0,0462	0,27	0,87	29,43
E 1	0,70	0,18	0,0453	0,32	0,94	25,10
E 2	0,80 ^a	0,16	0,0407	0,54	1,00	19,80

Istim slovima obeležena je signifikantna razlika. a, b, c $p \leq 0,05$; x, y, z $p \leq 0,01$



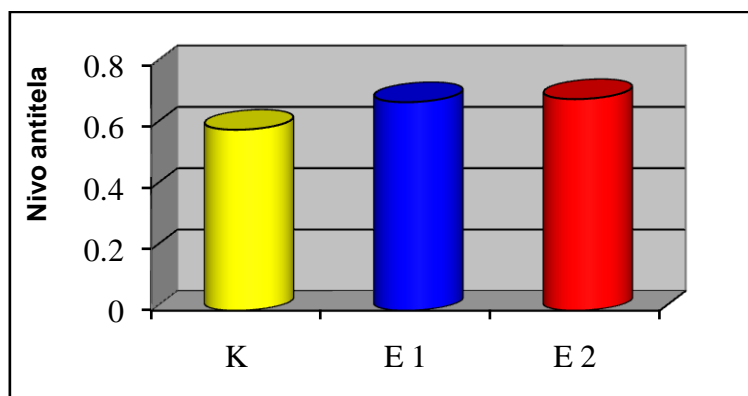
Grafikon 5. Prosečne vrednosti nivoa antistafilokoknih antitela u mleku ispitivanih krava 2. meseca

Statističkom analizom dobijenih podataka koji se odnose na srednju vrednost nivoa antistafilokoknih antitela u mleku 3. meseca, nije ustanovljena statistički značajna razlika između svih eksperimentalnih grupa (Grafikon 6). Daljom analizom je utvrđeno da je srednja vrednost nivoa antistafilokoknih antitela bila najveća kod eksperimentalne grupe 2 i iznosila je $0,69 \pm 0,17$ OD, dok je najmanja vrednost utvrđena kod kontrolne grupe gde je iznosila $0,59 \pm 0,18$ OD. U esperimentanoj grupi 1 srednja vrednost nivoa stafilocoknih antitela bila je niža nego u eksperimentalnoj grupi 2, i iznosila je $0,68 \pm 0,18$ OD (Tabela 8).

Tabela 8. Deskriptivni statistički parametri nivoa antistafilokoknih antitela u mleku 3. meseca

Grupe	\bar{X}	SD	Sx	Minimum	Maximum	CV%
K	0,59	0,18	0,0451	0,20	0,82	29,78
E 1	0,68	0,18	0,0457	0,28	1,00	26,21
E 2	0,69	0,17	0,0436	0,46	1,04	24,62

Istim slovima obeležena je signifikantna razlika. a, b, c $p \leq 0,05$; x, y, z $p \leq 0,01$



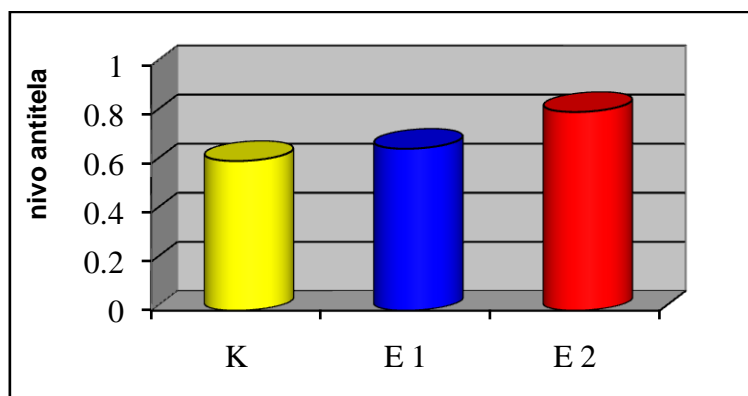
Grafikon 6. Prosečne vrednosti nivoa antistafilokoknih antitela u mleku ispitivanih krava 3. meseca

Statističkom analizom ustanovljeno je da je kod eksperimentalne grupe 2 srednja vrednost nivoa antitela četvrtog meseca u mleku bila najveća i iznosila je $0,81 \pm 0,14$ OD, kod eksperimentalne grupe 1 je iznosila $0,66 \pm 0,21$ OD, a najmanja je bila kod kontrolne grupe krava ($0,61 \pm 0,14$ OD) (Grafikon 7). Daljom analizom je ustanovljena vrlo značajna razlika u koncentraciji antitela ($p \leq 0,01$) kod kontrolne grupe krava u odnosu na eksperimentalnu grupu 2. Analizom su ustanovljene značajne razlike ($p \leq 0,05$) između eksperimentalne grupe 1 i eksperimentalne grupe 2 (Tabela 9).

Tabela 9. Deskriptivni statistički parametri nivoa antistafilokoknih antitela u mleku 4. meseca

Grupe	\bar{X}	SD	Sx	Minimum	Maximum	CV%
K	0,61 ^x	0,14	0,0366	0,34	0,85	23,31
E 1	0,66 ^a	0,21	0,0530	0,21	0,99	1,24
E 2	0,81 ^{xa}	0,14	0,0373	0,62	1,04	17,87

Istim slovima obeležena je signifikantna razlika. a, b, c $p \leq 0,05$; x, y, z $p \leq 0,01$



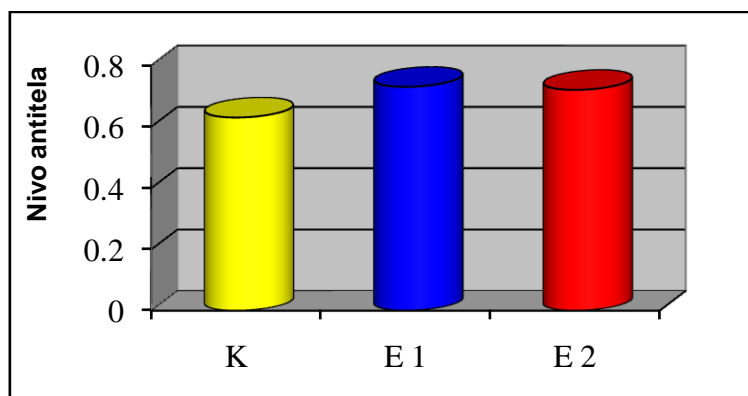
Grafikon 7. Prosečne vrednosti nivoa antistafilokoknih antitela u mleku ispitivanih krava 4. meseca

Analizom dobijenih podataka nije ustanovljena statistički značajna razlika u nivou srednje vrednosti antistafilokoknih antitela u mleku između svih eksperimentalnih grupa petog meseca oglada (Grafikon 8). Srednja vrednost nivoa antistafilokoknih antitela bila je najveća kod eksperimentalne grupe 1 i iznosila je $0,73 \pm 0,15$ OD. Nešto manja vrednost bila je kod eksperimentalne grupe 2, gde je iznosila $0,72 \pm 0,21$ OD, a najmanja srednja vrednost nivoa antistafilokoknih antitela zabeležena je u kontrolnoj grupi, i iznosila je $0,63 \pm 0,17$ OD (Tabela 10).

Tabela 10. Deskriptivni statistički parametri nivoa antistafilokoknih antitela u mleku 5. meseca

Grupe	\bar{X}	SD	Sx	Minimum	Maximum	CV%
K	0,63	0,17	0,0428	0,30	0,90	26,23
E 1	0,73	0,15	0,0385	0,45	0,98	20,34
E 2	0,72	0,21	0,0544	0,26	1,05	29,22

Istim slovima obeležena je signifikantna razlika. a, b, c $p \leq 0,05$; x, y, z $p \leq 0,01$



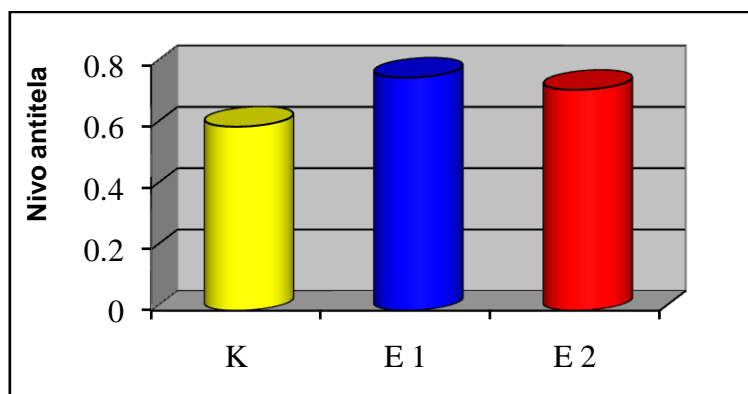
Grafikon 8. Prosečne vrednosti nivoa antistafilokoknih antitela u mleku ispitivanih krava 5. meseca

Statističkom analizom ustanovljeno je da je kod eksperimentalne grupe 1 srednja vrednost nivoa antistafilokoknih antitela 6. meseca bila najveća, i iznosila je $0,76 \pm 0,13$ OD, dok je najniži nivo antitela u tom periodu bio kod kontrolne grupe krava, gde je iznosio $0,60 \pm 0,15$ OD (Grafikon 9). Daljom statističkom analizom ustanovljena je značajno manja koncentracija antistafilokoknih antitela ($p \leq 0,05$) kod kontrolne grupe krava u odnosu na eksperimentalnu grupu 1. Analizom nisu ustanovljene značajne razlike ($p \geq 0,05$) između kontrolne i eksperimentalne grupe 2, kao ni između dve eksperimentalne grupe krava (Tabela 11).

Tabela 11. Deskriptivni statistički parametri nivoa antistafilokoknih antitela u mleku 6. meseca

Grupe	\bar{X}	SD	Sx	Minimum	Maximum	CV%
K	0,60 ^a	0,15	0,0374	0,33	0,80	24,11
E 1	0,76 ^a	0,13	0,0322	0,60	0,99	16,09
E 2	0,72	0,18	0,0456	0,48	1,13	24,67

Istim slovima obeležena je signifikantna razlika. a, b, c $p \leq 0,05$; x, y, z $p \leq 0,01$



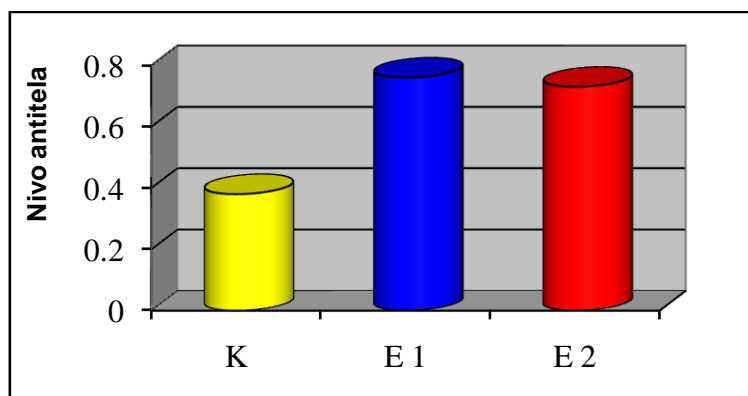
Grafikon 9. Prosečne vrednosti nivoa antistafilokoknih antitela u mleku ispitivanih krava 6. meseca

Analizom dobijenih podataka nije ustanovljena statistički značajna razlika u nivou antistafilokoknih antitela u mleku između svih eksperimentalnih grupa sedmog meseca oglada (Grafikon 10). Srednja vrednost nivoa antitela bila je najveća kod eksperimentalne grupe 1 i iznosila je $0,76 \pm 0,18$ OD. Ista vrednost je bila nešto manja kod eksperimentalne grupe 2, gde je iznosila $0,73 \pm 0,14$ OD, a najmanja vrednost antistafilokoknih antitela sedmog meseca oglada je zabeležena kod kontrolne grupe krava, i iznosila je $0,62 \pm 0,18$ OD (Tabela 12).

Tabela 12. Deskriptivni statistički parametri nivoa antistafilokoknih antitela u mleku 7. meseca

Grupe	\bar{X}	SD	Sx	Minimum	Maximum	CV%
K	0,62	0,18	0,0454	0,37	0,88	28,50
E 1	0,76	0,18	0,0471	0,31	0,99	24,06
E 2	0,73	0,14	0,0356	0,50	1,03	18,93

Istim slovima obeležena je signifikantna razlika. a, b, c $p \leq 0,05$; x, y, z $p \leq 0,01$



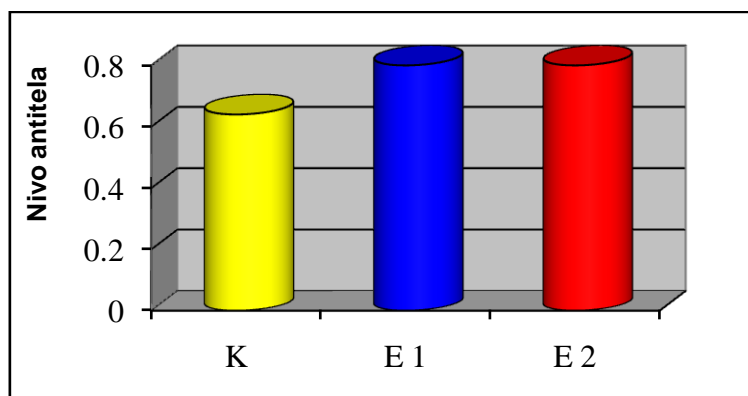
Grafikon 10. Prosečne vrednosti nivoa antistafilokoknih antitela u mleku ispitivanih krava 7. meseca

Statističkom analizom je ustanovljeno da je kod eksperimentalne grupe 2 srednja vrednost nivoa antistafilokoknih antitela u mleku osmog meseca ogleđa iznosila $0,80 \pm 0,16$ OD, a kod eksperimentalne grupe 1 je bila skoro identična i iznosila je $0,80 \pm 0,19$ OD. Kod kontrolne grupe krava nivo antitela u mleku osmog meseca ogleđa je iznosio $0,64 \pm 0,14$ OD (Grafikon 11). Daljom statističkom analizom ustanovljena je značajno manja koncentracija antistafilokoknih antitela ($p \leq 0,05$) kod kontrolne grupe krava u odnosu na eksperimentalnu grupu 2, kao i u odnosu na eksperimentalnu grupu 1. Na osnovu vrednosti statističkih parametara nisu ustanovljene značajne razlike između eksperimentalnih grupa 1 i 2 ($p \geq 0,05$) (Tabela 13).

Tabela 13. Deskriptivni statistički parametri nivoa antistafilokoknih antitela u mleku 8. meseca

Grupe	\bar{X}	SD	Sx	Minimum	Maximum	CV%
K	0,64 ^{ab}	0,14	0,0372	0,41	0,94	22,69
E 1	0,80 ^a	0,19	0,0498	0,59	1,20	24,08
E 2	0,80 ^b	0,16	0,0414	0,48	1,12	19,99

Istim slovima obeležena je signifikantna razlika. a, b, c $p \leq 0,05$; x, y, z $p \leq 0,01$



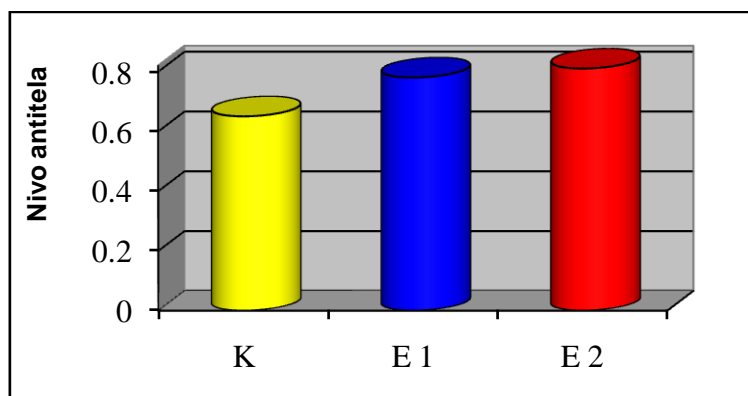
Grafikon 11. Prosečne vrednosti nivoa antistafilokoknih antitela u mleku ispitivanih krava 8. meseca

Posmatrajući ceo period, statističkom analizom je ustanovljeno da je kod krava iz eksperimentalne grupe 2 srednja vrednost nivoa antistafilokoknih antitela u mleku bila najveća, i iznosila je $0,81 \pm 0,21$ OD. Kod eksperimentalne grupe 1 ova vrednost je iznosila $0,78 \pm 0,21$ OD, a najmanja vrednost antitela u mleku je zabeležena kod kontrolne grupe krava, gde je iznosila $0,65 \pm 0,18$ OD (Grafikon 12). Daljom statističkom analizom ustanovljena je vrlo značajna razlika u koncentraciji antistafilokoknih antitela ($p \leq 0,01$) kod kontrolne grupe krava u odnosu na eksperimentalne grupe 1 i 2. Statističkom analizom nisu ustanovljene značajne razlike ($p \geq 0,05$) u vrednosti nivoa antistafilokoknih antitela u mleku, između eksperimentalnih grupa 1 i 2 (Tabela 14).

Tabela 14. Deskriptivni statistički parametri nivoa antistafilokoknih antitela u mleku, u toku celog perioda

Grupe	\bar{X}	SD	Sx	Minimum	Maximum	CV%
K	0,65 ^{xy}	0,18	0,0159	0,19	1,10	28,19
E 1	0,78 ^x	0,21	0,0180	0,21	1,30	26,79
E 2	0,81 ^y	0,21	0,0177	0,26	1,32	25,21

Istim slovima obeležena je signifikantna razlika. a, b, c $p \leq 0,05$; x, y, z $p \leq 0,01$



Grafikon 12. Prosečne vrednosti nivoa antistafilokoknih antitela u mleku ispitivanih krava, u toku celog perioda ogleda

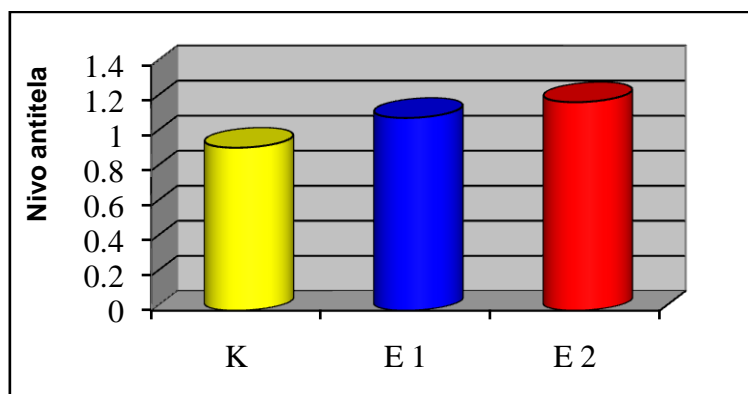
5.5. Rezultati nivoa antistreptokoknih antitela u mleku

Statističkom analizom dobijenih podataka koji se odnose na vrednost nivoa antistreptokoknih antitela u mleku na početku ogleda, nije ustanovljena statistički značajna razlika između grupa (Grafikon 13). Srednja vrednost nivoa antitela bila je najveća kod eksperimentalne grupe 2 i iznosila je $1,19 \pm 0,55$ OD. Kod eksperimentalne grupe 1 ova vrednost je iznosila $1,10 \pm 0,42$ OD, a najmanja vrednost nivoa antistreptokoknih antitela u mleku na početku ogleda je zabeležena kod kontrolne grupe, gde je iznosila $0,93 \pm 0,39$ OD (Tabela 15).

Tabela 15. Deskriptivni statistički parametri nivoa antistreptokoknih antitela u mleku nultog dana, pre početka ogleda

Grupe	\bar{X}	SD	Sx	Minimum	Maximum	CV%
K	0,93	0,39	0,10	0,45	1,58	41,85
E 1	1,10	0,42	0,1089	0,46	1,89	38,50
E 2	1,19	0,55	0,14	0,36	2,07	39,66

Istim slovima obeležena je signifikantna razlika. a, b, c $p \leq 0,05$; x, y, z $p \leq 0,01$



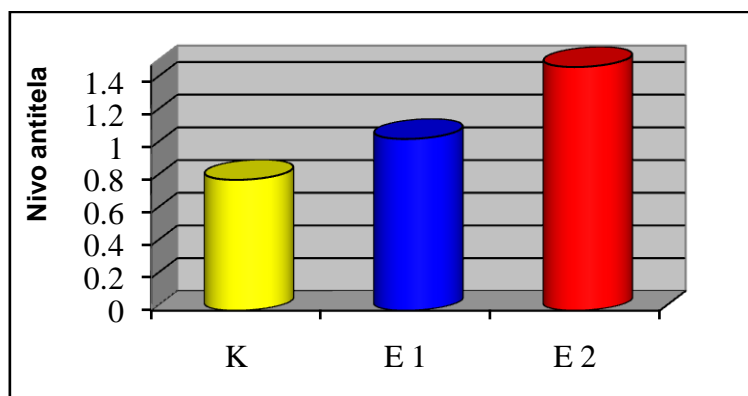
Grafikon 13. Prosečne vrednosti nivoa antistreptokoknih antitela u mleku ispitivanih krava nultog dana, pre početka ogleda

Statističkom analizom dobijenih podataka koji se odnose na vrednost nivoa antistreptokoknih antitela u mleku nakon prvog meseca ogleda, ustanovljeno je da je kod eksperimentalne grupe 2 srednja vrednost nivoa antitela bila najveća, i iznosila je $1,49 \pm 0,79$ OD. Kod eksperimentalne grupe 1 ova vrednost je iznosila $1,05 \pm 0,56$ OD, a najmanja vrednost nivoa antitela u mleku prvog meseca je bila kod kontrolne grupe krava, gde je iznosila $0,80 \pm 0,55$ OD (Grafikon 14). Analizom je ustanovljena značajno manja koncentracija antistreptokoknih antitela ($p \leq 0,05$) kod kontrolne grupe krava u odnosu na eksperimentalnu grupu 2. Daljom analizom nisu ustanovljene značajne razlike ($p \geq 0,05$) u vrednosti nivoa antitela u mleku prvog meseca ogleda između kontrolne i eksperimentalne grupe 1, kao ni između dve eksperimentalne grupe krava (Tabela 16).

Tabela 16. Deskriptivni statistički parametri nivoa antistreptokoknih antitela u mleku 1. meseca

Grupe	\bar{X}	SD	Sx	Minimum	Maximum	CV%
K	0,80 ^a	0,55	0,1417	0,06	1,79	68,73
E 1	1,05	0,56	0,1439	0,28	2,03	53,23
E 2	1,49 ^a	0,79	0,2046	0,31	3,16	53,34

Istim slovima obeležena je signifikantna razlika. a, b, c $p \leq 0,05$; x, y, z $p \leq 0,01$



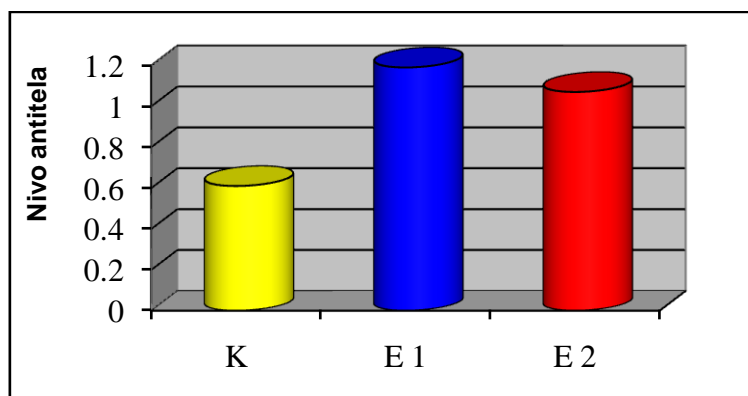
Grafikon 14. Prosečne vrednosti nivoa antistreptokoknih antitela u mleku ispitivanih krava 1. meseca

Statističkom analizom dobijenih podataka koji se odnose na vrednost nivoa antistreptokoknih antitela u mleku nakon drugog meseca ogleda, nije ustanovljena statistički značajna razlika između oglednih grupa (Grafikon 15). Srednja vrednost nivoa antitela bila je najveća kod eksperimentalne grupe 1 i iznosila je $1,19 \pm 0,90$ OD. Kod eksperimentalne grupe 2 ova vrednost je bila niža i iznosila je $1,07 \pm 0,64$ OD, a najmanja vrednost nivoa antitela u mleku nakon drugog meseca ogleda je zabeležena kod kontrolne grupe, gde je iznosila $0,61 \pm 0,49$ OD (Tabela 17).

Tabela 17. Deskriptivni statistički parametri nivoa antistreptokoknih antitela u mleku 2. meseca

Grupe	\bar{X}	SD	Sx	Minimum	Maximum	CV%
K	0,61	0,49	0,1263	0,05	1,90	80,32
E 1	1,19	0,90	0,2317	0,21	3,89	75,75
E 2	1,07	0,64	0,1649	0,40	2,58	59,76

Istim slovima obeležena je signifikantna razlika. a, b, c $p \leq 0,05$; x, y, z $p \leq 0,01$



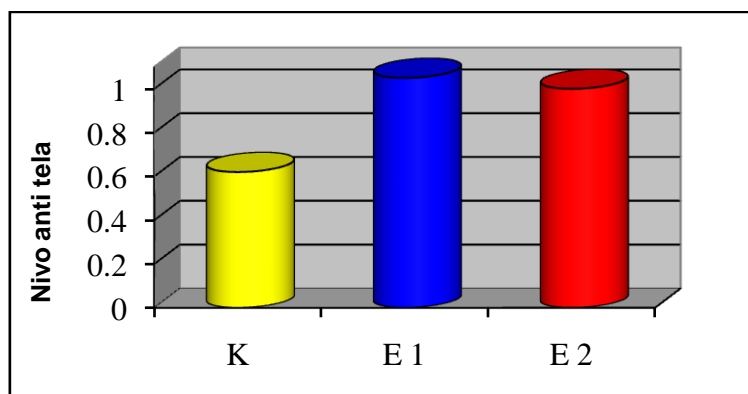
Grafikon 15. Prosečne vrednosti nivoa antistreptokoknih antitela u mleku ispitivanih krava 2. meseca

Statističkom analizom dobijenih podataka koji se odnose na vrednost nivoa antistreptokoknih antitela nakon trećeg meseca ogleđa, ustanovljeno je da je kod eksperimentalne grupe 1 srednja vrednost bila najveća i iznosila je $1,05 \pm 0,41$ OD. Nešto niža vrednost je zabeležena kod eksperimentalne grupe 2, gde je iznosila $1,04 \pm 0,60$ OD, a najmanja vrednost nivoa antistreptokoknih antitela u mleku nakon trećeg meseca ogleđa bila je kod kontrolne grupe krava, i iznosila je $0,62 \pm 0,30$ OD (Grafikon 16). Daljom statističkom analizom ustanovljena je značajno manja koncentracija antistreptokoknih antitela ($p \leq 0,05$) kod kontrolne grupe krava u odnosu na eksperimentalne grupe 1 i 2. Na osnovu deskriptivnih statističkih parametara nisu ustanovljene značajne razlike ($p \geq 0,05$) u vrednosti nivoa ispitivanih antitela nakon trećeg meseca ogleđa, između dve eksperimentalne grupe krava (Tabela 18).

Tabela 18. Deskriptivni statistički parametri nivoa antistreptokoknih antitela u mleku 3. meseca

Grupe	\bar{X}	SD	Sx	Minimum	Maximum	CV%
K	0,62 ^{ab}	0,30	0,0773	0,12	1,24	47,97
E 1	1,05 ^a	0,41	0,1052	0,34	1,71	38,79
E 2	1,04 ^b	0,60	0,1540	0,34	2,03	57,18

Istim slovima obeležena je signifikantna razlika. a, b, c $p \leq 0,05$; x, y, z $p \leq 0,01$



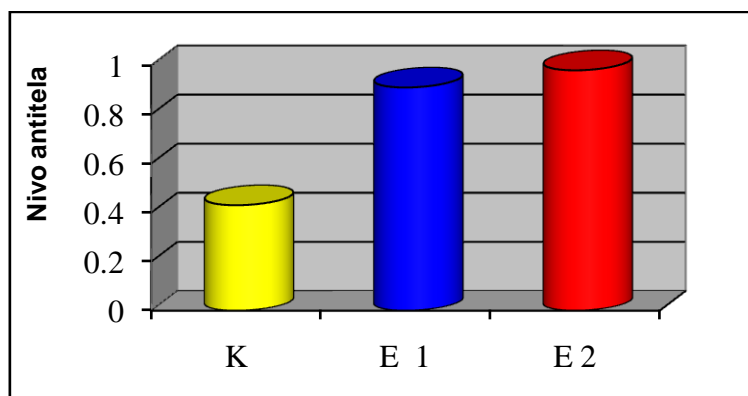
Grafikon 16. Prosečne vrednosti nivoa antistreptokoknih antitela u mleku ispitivanih krava 3. meseca

Statističkom analizom je ustanovljeno da je kod eksperimentalne grupe 2 srednji nivo antistreptokoknih antitela u mleku nakon četvrtog meseca oglada bio najveći i iznosio je $0,98 \pm 0,56$ OD. Nešto niže vrednosti su konstatovane kod eksperimentalne grupe 1, gde je nivo antistreptokoknih antitela iznosio $0,91 \pm 0,47$ OD, a najmanja vrednost nivoa antistreptokoknih antitela u mleku nakon četvrtog meseca oglada bila je kod kontrolne grupe krava, gde je iznosila $0,43 \pm 0,24$ OD (Grafikon 17). Daljom analizom ustanovljena je vrlo značajna razlika u koncentraciji antistreptokoknih antitela ($p \leq 0,01$) kod kontrolne grupe krava u odnosu na eksperimentalnu grupu 2. Takođe su ustanovljene značajne razlike ($p \leq 0,05$) i između kontrolne i eksperimentalne grupe 1. Statističkom analizom nisu ustanovljene značajne razlike ($p \geq 0,05$) između dve eksperimentalne grupe krava (Tabela 19).

Tabela 19. Deskriptivni statistički parametri nivoa antistreptokoknih antitela u mleku 4. meseca

Grupe	\bar{X}	SD	Sx	Minimum	Maximum	CV%
K	0,43 ^{ax}	0,24	0,0620	0,03	0,79	55,72
E 1	0,91 ^a	0,47	0,1215	0,13	1,65	51,66
E 2	0,98 ^x	0,56	0,1433	0,41	2,23	56,78

Istim slovima obeležena je signifikantna razlika. a, b, c $p \leq 0,05$; x, y, z $p \leq 0,01$



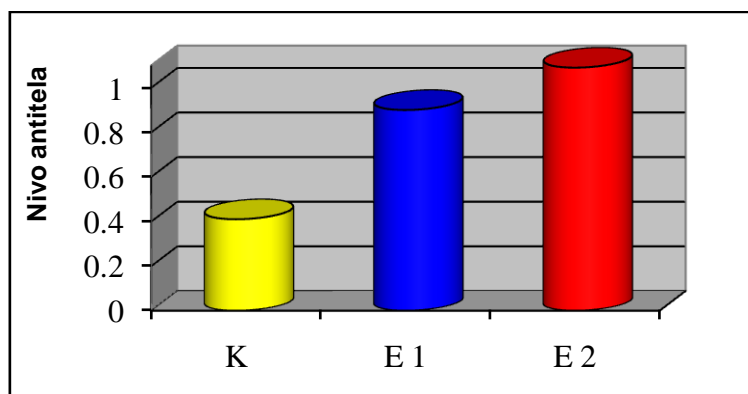
Grafikon 17. Prosečne vrednosti nivoa antistreptokoknih antitela u mleku ispitivanih krava 4. meseca

Statističkom analizom dobijenih podataka koji se odnose na vrednost nivoa antistreptokoknih antitela nakon petog meseca ogleda ustanovljeno je da je kod eksperimentalne grupe 2 srednja vrednosti nivoa antitela bila najveća, i iznosila je $1,09 \pm 0,62$ OD, a najmanja je bila kod kontrolne grupe krava, gde je iznosila $0,41 \pm 0,28$ OD. Kod eksperimentalne grupe 1 vrednost nivoa antitela nakon petog meseca ogleda je iznosila $0,90 \pm 0,55$ OD (Grafikon 18). Daljom analizom ustanovljena je vrlo značajna razlika u koncentracija antistreptokoknih antitela ($p \leq 0,01$) kod kontrolne grupe krava u odnosu na eksperimentalnu grupu 2. Statističkom analizom ustanovljene su i značajne razlike ($p \leq 0,05$) između kontrolne i eksperimentalne grupe 1, dok između dve eksperimentalne grupe krava nisu ustanovljene značajne razlike ($p \geq 0,05$) u vrednosti nivoa ispitivanih antitela nakon petog meseca ogleda (Tabela 20).

Tabela 20. Deskriptivni statistički parametri nivoa antistreptokoknih antitela u mleku 5. meseca

Grupe	\bar{X}	SD	Sx	Minimum	Maximum	CV%
K	0,41 ^{ax}	0,28	0,0714	0,05	1,03	67,86
E 1	0,90 ^a	0,55	0,1427	0,14	1,89	61,00
E 2	1,09 ^x	0,62	0,1589	0,29	2,18	56,72

Istim slovima obeležena je signifikantna razlika. a, b, c $p \leq 0,05$; x, y, z $p \leq 0,01$



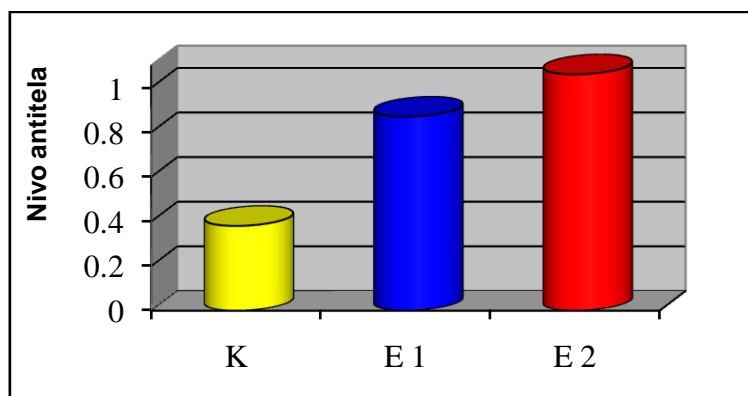
Grafikon 18. Prosečne vrednosti nivoa antistreptokoknih antitela u mleku ispitivanih krava 5. meseca

Statističkom analizom dobijenih podataka koji se odnose na vrednost nivoa antistreptokoknih antitela nakon šestog meseca oglada ustanovljeno je da je kod eksperimentalne grupe 2 srednja vrednosti nivoa antitela bila najveća, i iznosila je $1,06 \pm 0,59$ OD. S druge strane, najmanja vrednost je zabeležena kod kontrolne grupe krava, gde je iznosila $0,38 \pm 0,21$ OD. Kod eksperimentalne grupe 1 vrednost nivoa ispitivanih antitela nakon šestog meseca oglada je iznosila $0,87 \pm 0,61$ OD (Grafikon 19). Analizom je ustanovljena vrlo značajna razlika u koncentraciji antitela ($p \leq 0,01$) kod kontrolne grupe krava u odnosu na eksperimentalnu grupu 2. Daljom analizom ustanovljene su značajne razlike ($p \leq 0,05$) i između kontrolne i eksperimentalne grupe 1, a nisu ustanovljene značajne razlike ($p \geq 0,05$) između dve eksperimentalne grupe krava (Tabela 21).

Tabela 21. Deskriptivni statistički parametri nivoa antistreptokoknih antitela u mleku 6. meseca

Grupe	\bar{X}	SD	Sx	Minimum	Maximum	CV%
K	$0,38^{ax}$	0,21	0,0548	0,05	0,71	56,09
E 1	$0,87^a$	0,61	0,1562	0,12	2,29	69,15
E 2	$1,06^x$	0,59	0,1535	0,35	2,15	56,10

Istim slovima obeležena je signifikantna razlika. a, b, c $p \leq 0,05$; x, y, z $p \leq 0,01$



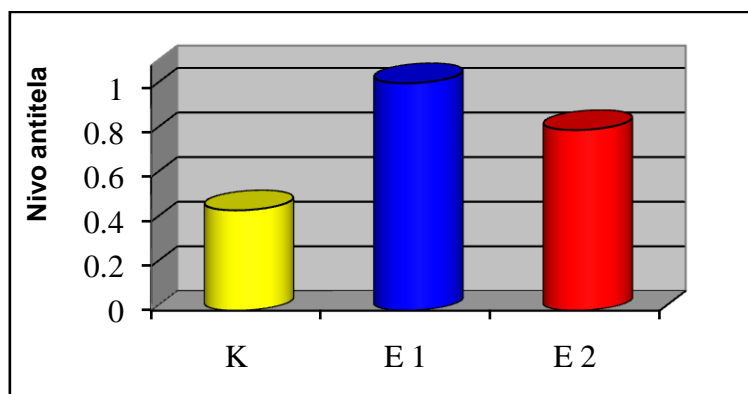
Grafikon 19. Prosečne vrednosti nivoa antistreptokoknih antitela u mleku ispitivanih krava 6. meseca

Statističkom analizom dobijenih podataka koji se odnose na vrednost nivoa antistreptokoknih antitela nakon sedmog meseca ogleđa ustanovljeno je da je kod eksperimentalne grupe 1 srednja vrednost nivoa antitela bila najveća, i iznosila je $1,02 \pm 0,65$ OD. Kod eksperimentalne grupe 2 ova vrednost je iznosila $0,81 \pm 0,62$ OD, a najmanja vrednost antistreptokoknih antitela bila je kod kontrolne grupe krava, gde je iznosila $0,45 \pm 0,33$ OD (Grafikon 20). Daljom analizom ustanovljena je značajno manja koncentracija antitela ($p \leq 0,05$) kod kontrolne grupe krava u odnosu na eksperimentalnu grupu 1. Na osnovu deskriptivnih statističkih parametara nisu ustanovljene značajne razlike ($p \geq 0,05$) između kontrolne i eksperimentalne grupe 2, kao ni između dve eksperimentalne grupe krava (Tabela 22).

Tabela 22. Deskriptivni statistički parametri nivoa antistreptokoknih antitela u mleku 7. meseca

Grupe	\bar{X}	SD	Sx	Minimum	Maximum	CV%
K	0,45 ^a	0,33	0,0842	0,06	0,97	71,95
E 1	1,02 ^a	0,65	0,1676	0,21	2,44	63,17
E 2	0,81	0,62	0,1592	0,33	2,64	76,11

Istim slovima obeležena je signifikantna razlika. a, b, c $p \leq 0,05$; x, y, z $p \leq 0,01$



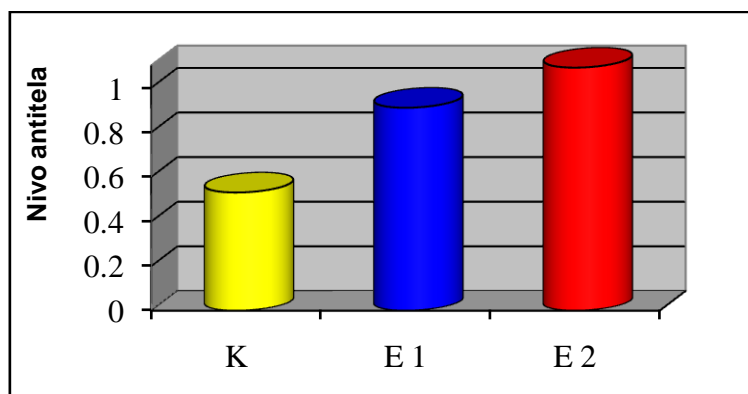
Grafikon 20. Prosečne vrednosti nivoa antistreptokoknih antitela u mleku ispitivanih krava 7. meseca

Statističkom analizom dobijenih podataka koji se odnose na vrednost nivoa antistreptokoknih antitela nakon osmog meseca oglada ustanovljeno je da je kod eksperimentalne grupe 2 srednja vrednosti nivoa antitela bila najveća, i iznosila je $1,09 \pm 0,70$ OD. Niža koncentracija antitela je konstatovana kod eksperimentalne grupe 1, gde je iznosila $0,91 \pm 0,62$ OD, a najmanja vrednost antistreptokoknih antitela nakon osmog meseca oglada je konstatovana kod kontrolne grupe krava, gde je iznosila $0,53 \pm 0,21$ OD (Grafikon 21). Daljom analizom ustanovljena je značajno manja koncentracija antitela ($p \leq 0,05$) kod kontrolne grupe krava u odnosu na eksperimentalnu grupu 2, dok na osnovu statističkih parametara nisu ustanovljene značajne razlike ($p \geq 0,05$) između kontrolne i eksperimentalne grupe 1, kao ni između dve eksperimentalne grupe krava (Tabela 23).

Tabela 23. Deskriptivni statistički parametri nivoa antistreptokoknih antitela u mleku 8. meseca

Grupe	\bar{X}	SD	Sx	Minimum	Maximum	CV%
K	0,53 ^a	0,28	0,0726	0,09	0,95	53,37
E 1	0,91	0,62	0,1595	0,28	2,65	67,86
E 2	1,09 ^a	0,70	0,18	0,26	2,68	63,85

Istim slovima obeležena je signifikantna razlika. a, b, c $p \leq 0,05$; x, y, z $p \leq 0,01$



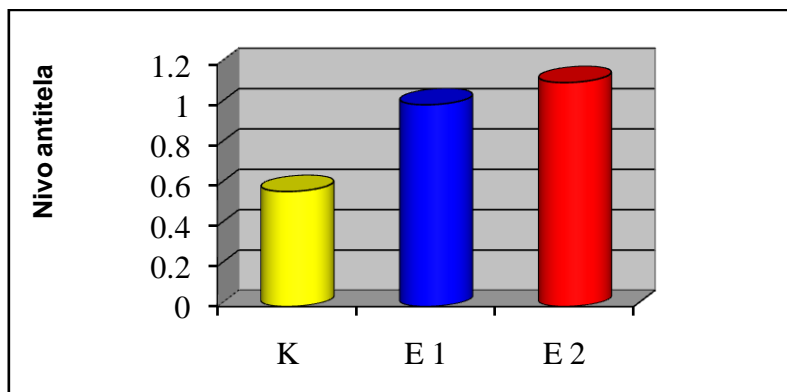
Grafikon 21. Prosečne vrednosti nivoa antistreptokoknih antitela u mleku ispitivanih krava 8. meseca

Posmatrajući ceo period, statističkom analizom je ustanovljeno da je kod eksperimentalne grupe 2 srednja vrednost nivoa antistreptokoknih antitela u mleku bila najveća, i iznosila je $1,11 \pm 0,64$ OD. Kod eksperimentalne grupe 1 ova vrednost je bila nešto niža i iznosila je $1,00 \pm 0,58$ OD, dok je vrednost nivoa antistreptokoknih antitela u mleku bila najmanja kod kontrolne grupe krava, gde je iznosila $0,57 \pm 0,39$ OD (Grafikon 22). Daljom analizom ustanovljena je vrlo značajna razlika u koncentraciji streptokoknih antitela ($p \leq 0,01$) kod kontrolne grupe krava u odnosu na eksperimentalne grupe 1 i 2. S druge strane, na osnovu deskriptivnih statističkih parametara nisu ustanovljene značajne razlike ($p \geq 0,05$) između eksperimentalnih grupa 1 i 2 (Tabela 24).

Tabela 24. Deskriptivni statistički parametri nivoa antistreptokoknih antitela u mleku, u toku celog perioda

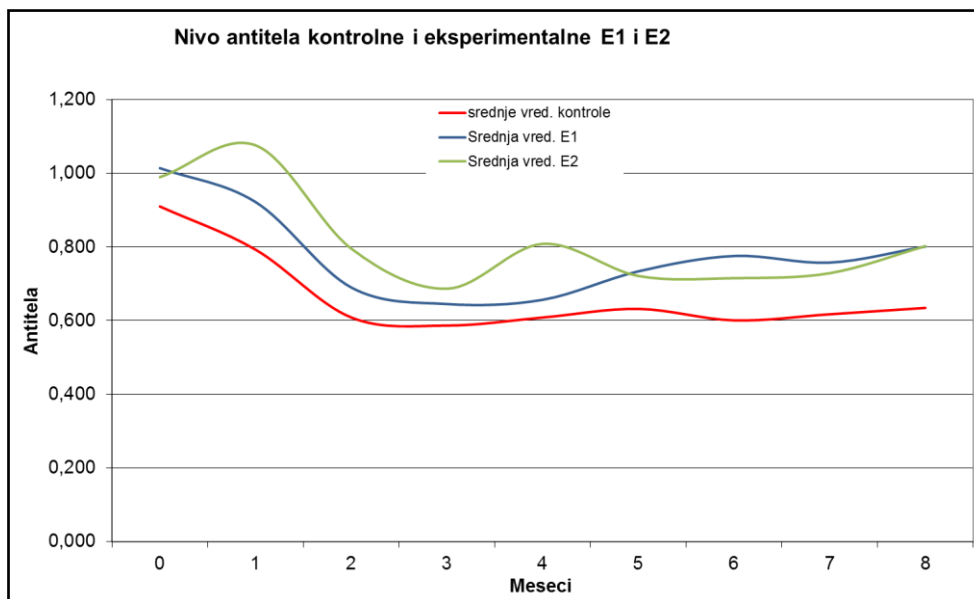
Grupe	\bar{X}	SD	Sx	Minimum	Maximum	CV%
K	0,57 ^{xy}	0,39	0,0336	0,03	1,90	67,96
E 1	1,00 ^x	0,58	0,0502	0,12	3,89	58,24
E 2	1,11 ^y	0,64	0,0554	0,26	3,16	57,85

Istim slovima obeležena je signifikantna razlika. a, b, c $p \leq 0,05$; x, y, z $p \leq 0,01$



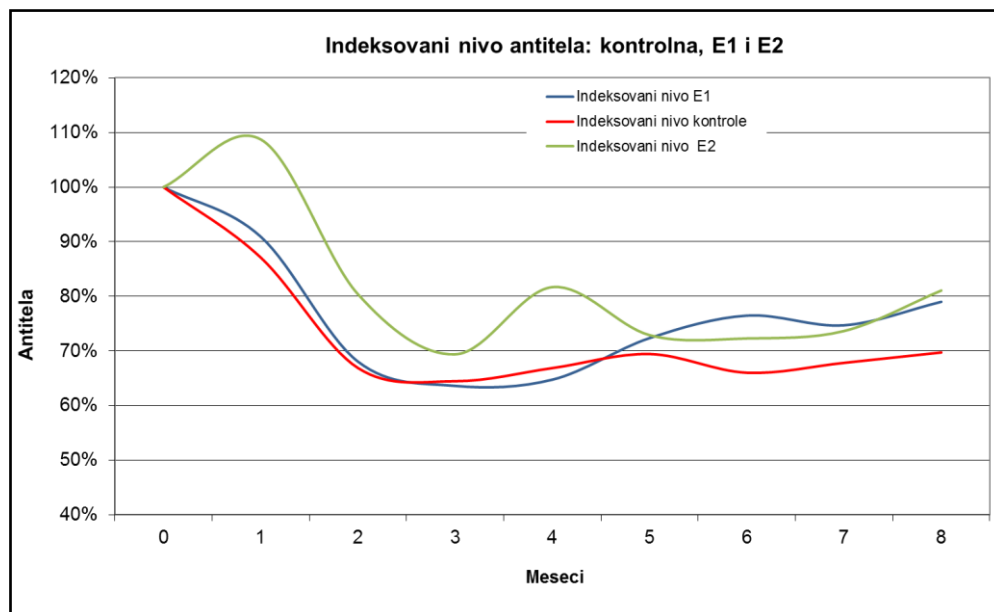
Grafikon 22. Prosečne vrednosti nivoa antistreptokoknih antitela u mleku ispitivanih krava, u toku celog perioda ogleda

Na osnovu podataka iz grafikona 23, može da se zaključi da ja srednja vrednost nivoa antistafilokoknih antitela kontrolne grupe tokom celog perioda ispitivanja bila niža nego kod eksperimentalnih grupa 1 i 2. Vrednost nivoa antitela kontrolne grupe na početku ogleda bila je oko 0,900 OD, da bi već posle prvog meseca ta vrednost pala ispod 0,600 OD. Vrednost titra antistafilokoknih antitela kod eksperimentalne grupe 2 na početku ogleda iznosila je oko 1,00 OD, da bi se u toku prvog meseca ta vrednost povećala na 1,100 OD, a zatim pala na vrednost od 0,700 OD, i na tom nivou se održala do kraja ogleda, sa jednim blagim skokom vrednosti u četvrtom mesecu na 0,800 OD. Vrednost antistafilokoknih antitela kod eksperimentalne grupe 1 na početku ogleda bila je oko 1,00 OD, da bi zatim pala do vrednosti titra od 0,65 OD do kraja drugog meseca i na toj vrednosti se zadržala do petog meseca, kada je došlo do laganog rasta do 0,75 OD. Iz grafikona može da se vidi da je na kraju ogleda vrednost antistafilokoknih antitela ispitivanih u mleku kod eksperimentalnih grupa 1 i 2 bila skoro identična.



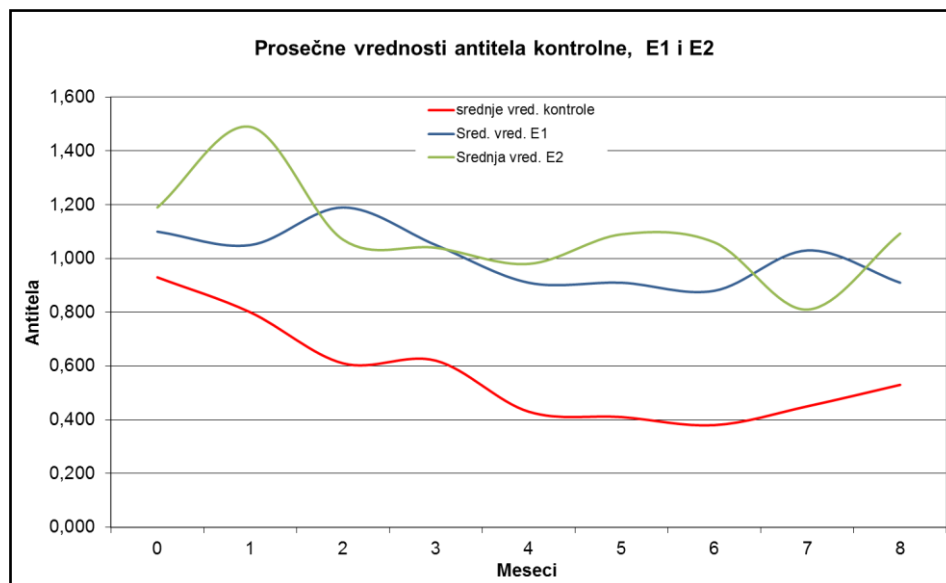
Grafikon 23. Srednje vrednosti nivoa antistafilokoknih antitela u mleku ispitivanih krava

Na grafikonu 24 su prikazane indeksovane vrednosti antistafilokoknih antitela u mleku svih oglednih grupa. Kao što može da se vidi, ove vrednosti kod kontrolne i eksperimentalne grupe 1 su u prvih pet meseci bile približno iste, tj. sa 100% od početne vrednosti pale su na 65% do petog meseca ispitivanja. Indeksovane vrednosti kontrolne grupe do kraja ogleda su se zadržale na 70% od početnih vrednosti titra antitela. Za razliku od kontrolne grupe, kod eksperimentalne grupe 1 posle petog meseca došlo je do rasta indeksovanih vrednosti titra i do kraja ogleda dostigle su 80% od početnih vrednosti. Kod eksperimentalne grupe 2 indeksovane početne vrednosti sa 100% u toku prvog meseca rastu na 110%, a zatim vrednosti padaju na 70% do kraja trećeg meseca ogleda. Indeksovane vrednosti kod eksperimentalne grupe 2 pokazuju skok u toku četvrtog meseca ispitivanja i dolaze na vrednost od preko 82% od početnih vrednosti sa početka ogleda. Nakon ovog perioda vrednosti kod eksperimentalne grupe 2 padaju ispod vrednosti konstatovanih u eksperimentalnoj grupi 1, i iznosile su oko 75% od početnih vrednosti titra antitela. Na kraju ogleda, indeksovane vrednosti nivoa antistafilokoknih antitela u mleku eksperimentalnih grupa 1 i 2 bile su skoro identične.



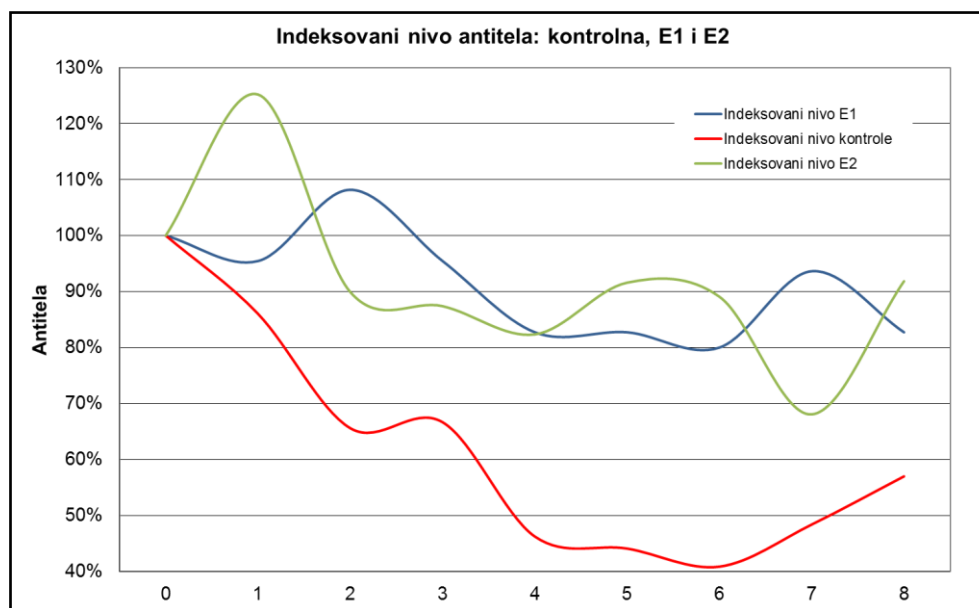
Grafikon 24. Indeksovani nivo vrednosti antistafilokoknih antitela u mleku ispitivanih krava

Iz grafikona 25 se vidi da je srednja vrednost nivoa antistreptokoknih antitela kontrolne grupe tokom celog perioda ispitivanja bila niža u odnosu na eksperimentalne grupe 1 i 2. Vrednosti nivoa antitela kod kontrolne grupe na početku ogleda bile su oko 0,900 OD, da bi već posle trećeg meseca te vrednosti pale na ispod 0,600 OD, a zatim do kraja sedmog meseca su dodatno pale i iznosile su 0,400 OD. Vrednosti nivoa antistreptokoknih antitela kod eksperimentalne grupe 2, na početku ogleda su iznosile 1,20 OD, da bi zatim pokazale u prvom mesecu rast do 1,50 OD, a posle drugog meseca su pokazale pad do 1,00 OD i na tom nivou su se održale sve do sedmog meseca. U sedmom mesecu nivo antitela pada do 0,800 OD, da bi ponovo pokazao tendenciju rasta pred kraj ogleda. Iz grafikona može da se vidi da nivo antistreptokoknih antitela kod eksperimentalne grupe 1 nema velikih variranja u vrednostima, koje su se kretale od 1,10 na početku ogleda, pa do 0,9 OD u poslednjim mesecima ispitivanja.



Grafikon 25. Srednje vrednosti nivoa antistreptokoknih antitela u mleku ispitivanih krava

Na grafikonu 26 su prikazane indeksovane vrednosti antistreptokoknih antitela u mleku kod svih grupa u ogledu. Kod kontrolne grupe ove vrednosti su sa 100% od početnih vrednosti već posle dva meseca ogleda pale na 65%, sa nastavljanjem tendencije pada, čak do 40% od početne vrednosti do kraja šestog meseca ogleda. Vrednosti specifičnih antistreptokoknih antitela u mleku kod eksperimentalne grupe 2, od početnih 100% u toku prvih mesec dana su porasle na 125%, a zatim je došlo do njihovog pada na 85% od početne vrednosti nivoa antitela do kraja četvrtog meseca. Kod eksperimentalne grupe 1, od početnih 100% vrednosti u toku drugog meseca, došlo je do rasta na 110% vrednosti, a zatim do pada na 80% od početne vrednosti antistreptokoknih antitela u mleku do sedmog meseca trajanja ogleda. U sedmom mesecu kod eksperimentalne grupe 1 ponovo dolazi do porasta vrednosti antistreptokoknih antitela, koja dostiže 95% od početne vrednosti, dok je kod eksperimentalne grupe 2 u istom periodu došlo do pada ove vrednosti na ispod 70% od početnih vrednosti.



Grafikon 26. Indeksovani nivo vrednosti antistreptokoknih antitela u mleku ispitivanih grupa

U tabeli 25 prikazani su rezultati ispitivanja broja somatskih ćelija, kao i koncentracija antitela u mleku prvotelkinja koje nisu primile vakcinu, a koje su korišćene kao osnovne vrednosti za poređenje sa vrednostima iz eksperimentalnih grupa u ogledu. Srednja vrednost broja somatskih ćelija u mleku prvotelkinja iznosila je 104.440 ± 50.964 . Koncentracija antitela u mleku na *S. aureus* iznosila je $0,127 \pm 0,0048$ OD, dok je koncentracija antitela na *Str. agalactiae* iznosila $0,138 \pm 0,0043$ OD. Ove vrednosti broja somatskih ćelija, kao i koncentracija antitela u mleku prvotelkinja koje nisu primile vakcinu, korišćene su kao osnovne vrednosti ispravnosti urađenih testova za poređenje sa eksperimentalnim grupama u ogledu.

Tabela 25. Ispitivanje SCC i nivoa antitela u 1ml mleka gravidnih junica

Ispitivanja	Prv. 1	Prv. 2	Prv. 3	Prv. 4	Prv. 5	Prv. 6	Prv. 7	Prv. 8	Prv. 9	Prv. 10	Srednja vrednost
Antitela u mleku (OD) <i>S. aureus</i>	0,080	0,162	0,186	0,209	0,116	0,155	0,127	0,082	0,046	0,119	$0,127 \pm 0,0048$
Antitela u mleku (OD) <i>Str. agalactiae</i>	0,165	0,125	0,185	0,193	0,096	0,124	0,176	0,045	0,121	0,156	$0,138 \pm 0,0043$
Broj SCC	108000	89000	41600	96000	102000	78400	208000	184000	83000	54400	104440 ± 50964

U tabeli 26 su prikazani procenti subkliničkih i kliničkih mastitisa izazvanih bakterijom *S. aureus* na početku i na kraju ogleda, kao i titar antistafilokoknih antitela u mleku ispitivanih krava. Iz tabele se vidi da je kod kontrolne grupe titar antistafilokoknih antitela bio najniži i iznosio je 0.65 ± 0.18 OD, a procenat mastitisa izazvanih bakterijom *S. aureus* u mleku je sa 40%, povećan na 53%. Subklinički mastitisi su dijagnostikovani kod 6 krava (40%), a klinički kod dve krave (13%). Kod eksperimentalne grupe 1 (E 1) titar antistafilokoknih antitela iznosio je 0.78 ± 0.21 OD, a procenat mastitisa izazvanih bakterijom *S.aureus* je smanjen sa 53% na 26,6%. Subklinički mastitisi su dijagnostikovani kod 4 (26,6%) krave, a klinički mastitisi izazvani ovim mikroorganizmom nisu dijagnostikovani. Najveći titar antistafilokoknih antitela je izmeren kod eksperimentalne grupe 2 (E 2) i iznosio je 0.81 ± 0.21 OD, a procenat mastitisa izazvanih bakterijom *S. aureus* je smanjen sa 40% na 20%. Subklinički mastitisi su dijagnostikovani kod 3 krave (20%), a klinički mastitisi izazvani ovim mikroorganizmom nisu dijagnostikovani.

Tabela 26. Procenat subkliničkih, kliničkih mastitisa i vrednosti titra antistafilokoknih antitela u mleku ispitivanih krava

Grupe	Broj krava	Procenat <i>S. aureus</i> na početku /broj krava	Procenat <i>S. aureus</i> na kraju /broj krava	Procenat subkliničkih mastitisa/broj krava	Procenat kliničkih mastitisa/ broj krava	Titar antistafilokoknih antitela
K	15	40 (6)	53,3 (8)	40 (6)	13,3 (2)	0.65 ± 0.18 OD
E1	15	53 (8)	26,6 (4)	26,6 (4)	/	0.78 ± 0.21 OD
E2	15	40 (6)	20 (3)	20 (3)	/	0.81 ± 0.21 OD

U tabeli 27 su prikazani procenti subkliničkih i kliničkih mastitisa izazvanih *Str. agalactiae* na početku i na kraju ogleda, kao i titar antistreptokoknih antitela u mleku ispitivanih krava. Iz tabele se vidi da je kod kontrolne grupe krava titar antistreptokoknih antitela bio najniži i iznosio je 0.57 ± 0.39 OD, a procent mastitisa izazvanih bakterijom *Str. agalactiae* u mleku je sa 20% smanjen na 13,3%. Subklinički mastitisi su dijagnostikovani kod 2 krave (13,3%), a klinički mastitisi izazvani

bakterijom *Str. agalactiae* nisu dijagnostikovani. Kod eksperimentalne grupe 1 (E 1) titar antistreptokoknih antitela iznosio je $1,00 \pm 0.58$ OD, a subklinički i klinički mastitisi izazvani bakterijom *Str. agalactiae* nisu dijagnostikovani. Najveći titar antistreptokoknih antitela je izmeren kod eksperimentalne grupe 2 (E 2) i iznosio je $1,11 \pm 0.64$ OD, a subklinički i klinički mastitisi izazvani bakterijom *Str. agalactiae* nisu dijagnostikovani ni kod ove grupe krava.

Tabela 27. Procenat subkliničkih, kliničkih mastitisa i vrednosti titra antistreptokoknih antitela u mleku ispitivanih krava

Grupe	Broj krava	Procenat <i>S. agalactiae</i> na početku/broj krava	Procenat <i>S. agalactiae</i> na kraju /broj krava	Procenat subkliničkih mastitisa/broj krava	Procenat kliničkih mastitisa/broj krava	Titar antistreptokok. antitela
K	15	20 (3)	13,3 (2)	13,3 (2)	/	0.57 ± 0.39 OD
E1	15	20 (3)	/	/	/	1.00 ± 0.58 OD
E2	15	20 (3)	/	/	/	1.11 ± 0.64 OD

6. DISKUSIJA

6.1. Opšte zdravstveno stanje vakcinisanih krava

Mastitisi krava se javljaju u kliničkom i subkliničkom obliku. Klinički oblik može da ima perakutni, akutni, subakutni i hronični tok bolesti. Najčešća forma hroničnog mastitisa je subklinički mastitis. Otkrivanje kliničkog mastitisa, po pravilu, ne predstavlja problem, s obzirom na jasno izražene znake zapaljenja. Prisustvo subkliničkog mastitisa, kod krava koje ne pokazuju simptome bolesti, utvrđuje se nalazom patogenih bakterija u uzorcima mleka.

Radovi iz oblasti vakcinisanja preživara protiv uzročnika mastitisa ukazuju na ograničen uspeh u dobijanju značajnijih rezultata imunoprofilakse.

U izvedenom eksperimentu, krave koje su bile subkutano vakcinisane nisu pokazivale promenu opšteg stanja, niti su imale povećanu telesnu temperaturu, ali je primećen mali čvorić na mestu aplikacije vakcine. Nordhaug (1994) u svom radu opisuje pojavu otoka na mestu davanja kod 32 (69,6%) krave, od ukupno 46 vakcinisanih. Otok je bio prisutan u blagoj formi i mogao je da se napipa 72 dana posle vakcinacije, a kod 8 krava, čak i do 216 dana posle vakcinacije. Dobijeni rezultati pokazuju slabiju reakciju tkiva na nosač vakcine, a otok na mestu aplikacije vakcine pojavio se kod 5 (8,33%) krava i nestao je za deset dana. Jedan od razloga blagog otoka i njegovog brzog povlačenja sa mesta aplikacije jeste i to što je ukupna količina vakcine za aplikovanje podeljena u dve manje doze i na taj način je izbegnuta veća reakcija tkiva na nosač vakcine, što može da predstavlja preporuku kod vakcinacije ove životinjske vrste vakcinama sa istim nosačem.

6.2. Mikrobiološko ispitivanje mleka krava obolelih od kliničkih i subkliničkih mastitisa

Procenjuje se da je najmanje 40% svih krava inficirano nekim od uzročnika mastitisa, ali samo 2-3% krava boluje od kliničkog mastitisa. Subklinički mastitisi izazvani bakterijama *S. agalactiae*, *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus aureus* i

Staphylococcus sp. su veoma česti i iznose 35-40% svih subkliničkih mastitisa (Stojanović, 2001). Međutim, ako se posmatra samo *Str. agalactiae* i *S. aureus*, subkliničkim mastitisima bilo je zahvaćeno od 16% (Nordhaug, 1994; Edinger, 2000), do 19% krava (Stojanović, 1979; Giraudo, 1997). Dobijeni rezultati pokazuju veću zastupljenost subkliničkih mastitisa u zapahtima ispitivanih krava od literaturnih podataka i ona iznosi od 20 do 40%, za razliku od kliničkih mastitisa, kojih je bilo 13,3%.

Roesch (2007) je ustanovio da subklinički mastitisi na farmama mogu da budu izazvani *S. aureus*-om kod 20% do 28% krava, koagulaza negativnim stafilokokama (CNS) kod 18% do 28%, *E. coli* kod 1% i *C. bovis* kod oko 5% krava, dok *S. agalactiae* u njegovim istraživanjima nije izolovan. Radovi Vakanjac i saradnika (2008) opisuju subkliničke mastitise izazvane *S. aureus*-om u mleku krava kod 19% do 33,3% krava, a kliničke mastitise izazvane istim mikroorganizmom kod 14,2% grla. Isti autori navode da su se subklinički mastitisi izazvani *Str. agalactiae* javili kod 9,5%, a klinički mastitisi kod 14,2% krava. Mnogo veću zastupljenost subkliničkih mastitisa izazvanih *S. aureus*-om izneo je u svom radu Watson (1996) od čak 43% subkliničkih mastitisa kod kontrolne grupe i 35,4% kod vakcinisanih grla. Slične rezultate iznosi i Giraudo (1997) u svom radu, gde su subklinički mastitisi izazvani *S. aureus*-om prisutni kod 40% krava u kontrolnoj grupi i 15% kod vakcinisanih krava. Subklinički mastitisi javili su se kod 14% životinja u kontrolnoj i kod 8,6% vakcinisanih životinja. Vakanjac i saradnici (2008) su ustanovili subkliničke mastitise izazvane *S. aureus*-om kod 23% krava u kontrolnoj grupi i kod 14,2% vakcinisanih krava, u odnosu na 33% krava sa subkliničkim oblikom mastitisa pre početka oglada tj. pre vakcinisanja.

Na osnovu dobijenih rezultata u izvedenom ispitivanju, može da se zaključi da su subklinički mastitisi izazvani *S. aureus*-om bili prisutni kod 40% kontrolnih krava, dok se kod eksperimentalnih grupa 1 i 2 (E 1 i E 2) taj procenat kretao od 20 do 26,6%, što je slično rezultatima Girauda (1997). Procenat pojavljivanja subkliničkih mastitisa izazvanih *Str. agalactiae* u izvedenom eksperimentu kretao se kod svih oglednih grupa (kontrolna, eksperimentalna 1 i 2) u procentu od 20% na početku oglada, dok je na kraju oglada samo kod kontrolne grupe iznosio 13,3%, a kod eksperimentalnih grupa 1 i 2 nije više dijagnostikovano. Iste rezultate pojavljivanja subkliničkih mastitisa izazvanih *Str. agalactie* kod vakcinisanih grupa krava dobio je u svom radu Giraudo (1997). Za

razliku od ovih rezultata, Keskin (2007) je posle aplikacije polivalentne vakcine, ustanovio 10% subkliničkih mastitisa izazvanih *Str. agalactiae* kod kontrolne grupe i čak 12,3% kod vakcinisanih životinja.

Veoma niska zastupljenost kliničkih mastitisa izazvanih *S. aureus*-om opisana je u radu Edingera (2000), gde je prisutnost kliničkih mastitisa kod krava kontrolne grupe iznosila 3,8%, a kod vakcinisanih krava 2,4%. U svom radu Girauda (1997) opisuje pojavu kliničkih mastitisa izazvanih *S. aureus*-om kod 12,5% kontrolnih jediniki i kod 2,5% vakcinisanih. Mnogo veća zastupljenost kliničkih mastitisa opisana je od strane Watsona (1996), gde je iznosila 34,5% kod krava kontrolne grupe i 16,3% kod krava koje su bile vakcinisane. Nordhaug (1994) u svom radu iznosi podatke da je prisutnost kliničkih mastitisa u ogledu kod kontrolne grupe bila 6%, a kod vakcinisanih jedinki nije bilo slučajeva pojave kliničkog mastitisa izazvanog *S. aureus*-om. U radovima Vakanjac i sar. (2008) nije bilo pojave slučajeva kliničkog mastitisa izazvanih *S. aureus*-om u vakcinisanoj grupi, dok je u kontrolnoj grupi taj procenat iznosio 14,2%.

Watson (1996) je u svom radu opisao 1% kliničkih streptokoknih mastitisa (*Streptococcus sp.*) kod kontrolne grupe i 0,6% kod ogledne grupe krava koja je primila streptokoknu vakcinu. Mnogo veću zastupljenost kliničkih streptokoknih mastitisa opisao je u radu Edinger (2000), koji navodi da su streptokokni mastitisi u kontrolnoj grupi bili prisutni u 15,2%, a u grupi krava koje su bile vakcinisane u 16,3%.

U izvedenom eksperimentu klinički mastitis izazvan *Str. agalactiae* ustanovljen je kod 2 krave u kontrolnoj grupi, odnosno u 13,3%, dok klinički mastitisi izazvani *Str. agalactiae* nisu ustanovljeni ni kod jedne životinje iz eksperimentalnih grupa koje su bile vakcinisane.

6.3. Broj somatskih ćelija u mleku oglednih grupa krava

U toku procesa involucije mlečne žlezde broj somatskih ćelija (SCC) se povećava do 1.000.000 ćelija/ml, verovatno kao posledica prestanka muže, da bi se pred sam partus broj ćelija ponovo smanjio na normalne vrednosti (Seiff, 1932; Schalm, 1971; Nickerson, 1989). Izvedena ispitivanja su pokazala da se broj somatskih ćelija u mleku na početku zasušenja krava kretao približno u okviru navedenih literaturnih podataka. Kod kontrolne grupe iznosio je 1.021.550 u 1ml mleka, kod eksperimentalne

grupe 1 SCC je bio oko 871.011, dok je kod eksperimentalne grupe 2 SCC iznosio 946.319 u 1 ml mleka. Na početku laktacije broj somatskih ćelija može da se kreće i do 2.500.000 ćelija u ml mleka (Frerking, 1961).

U izvedenom eksperimentu prosečan broj somatskih ćelija u mleku na početku laktacije iznosio je kod kontrolne grupe 799.550 u 1ml mleka, kod eksperimentalne grupe 1 SCC je iznosio 690.316, dok je kod eksperimentalne grupe 2 SCC iznosio 836.356 u 1 ml mleka. Kod jedne krave iz eksperimentalne grupe koja je primila vakcinu, na početku laktacije SCC iznosio je 2.048.000 ćelija/ml, na šta je ukazivao i Frerkin (1961) u svojim istraživanjima. U radu Vakanjac i saradnika (2008) opisuju se da su srednje vrednosti SCC kod kontrolne grupe iznosile 551.223 ćelija/ml, a kod eksperimentalne grupe 582.022 ćelija/ml mleka, što je veoma slično sa dobijenim rezultatima u izvedenom eksperimentu. Prosečna vrednost SCC u 1 ml mleka kod kontrolne grupe iznosila je 405.215 ± 41.893 , kod prve eksperimentalne grupe (E 1) 613.204 ± 38.123 , a kod druge eksperimentalne grupe (E 2) 527.681 ± 42.617 , što ukazuje da ne postoji značajno povećanje somatskih ćelija u mleku između grupa. Dobijeni rezultati se podudaraju sa rezultatima Nordhauga (1994), Giraudoa (1997), Hoedmakera (1999), Edingera (2000), Keskina (2007) i Prenafeta (2010), koji nisu konstatovali značajno povećanje broja somatskih ćelija u mleku između grupa.

6.4. Antistafilokokna i antistreptokokna antitela u mleku

Koncentracija antitela IgG u normalnom mleku je niska (1-2mg/ml) i zavisi od vaskularne propustljivosti barijere krv-mleko. Kada je ova barijera narušena tokom zapaljenske reakcije, koncentracija antitela dostiže 50-80 mg/ml u kolostrumu i sekretu inficiranog vimena (Stojić, 2001). Nivo antitela u zasušenju i kolostrumu je povećan, na šta ukazuju i dobijeni rezultati u izvedenom eksperimentu. Srednja vrednost nivoa specifičnih antistafilokoknih antitela u zasušenju kod kontrolne grupe (K) iznosila je $0,91 \pm 0,15$ OD, kod prve eksperimentalne grupe (E 1) $1,01 \pm 0,24$ OD, a kod druge eksperimentalne grupe (E 2) $0,99 \pm 0,17$ OD. Kolostralno mleko pokazalo je ponovo visok nivo antitela kod obe eksperimentalne grupe. Tokom celog ogleada vrednosti nivoa antitela kod eksperimentalne grupe 1 i 2 bile su više od vrednosti nivoa antitela kontrolne grupe. Srednje vrednosti specifičnih antistafilokoknih antitela kontrolne grupe

(K) iznosile su $0,650 \pm 0,18$, prve eksperimentalne grupe (E 1) $0,78 \pm 0,21$ OD, dok su vrednosti kod eksperimentalne grupe 2 (E 2) bile još više i iznosile su $0,81 \pm 0,21$ OD. Vrednosti titra specifičnih antistafilokoknih antitela kontrolne grupe (K) na početku ogleda iznosile su $0,91$ OD i tokom ogleda te vrednosti su pale do $0,59$ OD. Titar antistafilokoknih antitela iznosio je kod eksperimentalne grupe 1 (E 1) na početku ogleda $1,01$ OD i tokom perioda ispitivanja nivo antitela se spustio na $0,66$ OD, za razliku od nivoa antitela kod eksperimentalne grupe 2 (E 2), gde je na početku ogleda titar antitela iznosio $0,99$ OD, a najniže vrednosti tokom perioda ispitivanja su iznosile $0,72$ OD. Značajno viši nivo antitela kod eksperimentalnih grupa, u odnosu na kontrolnu grupu, tokom celog ogleda, utvrdili su Nordhaug (1994), Loeffler (1987), Opdebeeck (1985), O'Brien (2000), Vakanjac (2008), Pellegrino (2008), Perez (2009) i drugi. Srednje vrednosti titra specifičnih stafilokoknih antitela u mleku eksperimentalne grupe 2 (E 2), bile su statistički značajno veće u poređenju sa eksperimentalnom grupom 1 (E 1), slično rezultatima Watsona (1992), Giraudo (1997) i Prenafeta (2010), koji preporučuju ovaj način imunizacije mlečnih krava. Middleton (2009) u svom radu ispituje efikasnosti pripremljene vakcine, kao i titar specifičnih antitela u mleku kontrolne i vakcinisane grupe. Srednja vrednost titara specifičnih antistafilokoknih antitela u mleku kontrolne grupe iznosila je $0,046$, a vakcinisane grupe $0,227$, što statistički nije pokazivalo značajnost.

U izvedenom eksperimentu, srednje vrednosti specifičnih antistreptokoknih antitela kod kontrolne grupe (K) iznosile su $0,57 \pm 0,39$, kod eksperimentalne grupe 1 (E 1) su iznosile $1,00 \pm 0,58$ OD, a kod eksperimentalne grupe 2 (E 2) su bile još više i iznosile su $1,11 \pm 0,64$ OD. Vrednosti titra specifičnih antistreptokoknih antitela kod kontrolne grupe (K) na početku ogleda su iznosile $0,93 \pm 0,39$ OD i tokom ogleda te vrednosti su pale do $0,38 \pm 0,25$ OD. Nivo antitela kod eksperimentalne grupe 1 (E 1) bio je na početku ogleda $1,10 \pm 0,42$ OD i tokom perioda ispitivanja nivo antitela se spustio na $0,87 \pm 0,67$ OD, za razliku od nivoa antitela kod eksperimentalne grupe 2 (E 2), gde je na početku ogleda titar antitela bio $1,19 \pm 0,55$ OD, a najniža vrednost tokom perioda ispitivanja je iznosila $0,81 \pm 0,62$ OD. Dobijeni rezultati su slični rezultatima objavljenim u radovima Giraudo (1997), Avais (2007) i Xu (2011), koji ukazuju da u mleku vakcinisanih krava titar antistreptokoknih antitela je značajno veći nego kod kontrolnih grupa krava. Xu (2011) u svom radu ukazuje da revakcina dovodi do značajnog

povećanja titra antistafilokoknih i antistreptokoknih antitela u mleku, dok treća aplikacija vakcine ne dovodi do daljeg značajnog povećanja antitela. Keskin i saradnici (2007) ispitujući polivalentnu vakcinu nisu našli statističku značajnost u nivou titra specifičnih antitela vakcinisane grupe u odnosu na kontrolnu. U literaturi se nalazi mnogo manje podataka koji se odnose na ispitivanje vakcine protiv streptokoknih infekcija, jer terapija mastitisa izazvanih sa streptokokama penicilinskim preparatima je jednostavna, efikasna i jeftina.

Kod eksperimentalne grupe 2 (E 2) (vakcinisana mesec dana pre očekivanog porođaja i revakcinisana dva meseca posle porođaja) izmeren je viši nivo antistafilokoknih antitela u mleku u toku celog trajanja eksperimenta, u odnosu na eksperimentalnu 1 (E 1) i kontrolnu grupu (K). Procenat dijagnostikovanih mastitisa u eksperimentalnoj grupi 2 (E 2) izazvanih *S. aureus*-om je smanjen sa 40% na 20% tokom trajanja oglada, pri čemu su dijagnostikovani samo subklinički mastitisi. Prosečan nivo antistafilokoknih antitela u mleku kod eksperimentalne grupe 2 (E 2) iznosio je $0,81 \pm 0,21$, u odnosu na kontrolnu grupu (K) gde je izmeren $0,65 \pm 0,18$. Na osnovu ovih rezultata može da se zaključi da je ovaj nivo antitela bio dovoljan da spreči pojave novih stafilocoknih infekcija i smanji procenat pojavljivanja mastitisa do kraja oglada. Slične rezultate ovog načina vakcinisanja krava dobili su i drugi autori. Rezultati Prenafete (2010) koji je vakcinisao krave 45 dana pre porođaja i revakcinisao 35 dana posle partusa, vakcinom pripremljenom od inaktivisanih ćelija *S. aureus*, ukazuju na povećan nivo antistafilokoknih antitela koji redukuje pojavu mastitisa, sprečavanjem naseljavanja mlečne žlezde ovim mikroorganizmom. Watson (1992) u svom radu ukazuje na prednost vakcinisanja mesec dana pre porođaja i revakcinisanja mesec dana posle partusa, u odnosu na druge načine vakcinisanja. Nivo antistafilokoknih antitela vakcinisane grupe značajno je veći nego kod kontrolne grupe i grupe koje su dobile vakcinu i revakcinu pre porođaja. Efekat ovog načina vakcinisanja je značajno smanjio kliničke i subkliničke mastitise izazvane *S. aureus*-om. Giraudo (1997) je u svom radu dobio slične rezultate smanjenja subkliničkih i kliničkih mastitisa vakcinisane grupe, kada je aplikovao vakcinu mesec dana pred očekivani porođaj i 5 nedelja posle partusa.

Kod eksperimentalne grupe 1 (E 1) (vakcinisana dva meseca i revakcinisana mesec dana pred očekivani partus) izmeren je veći nivo antistafilokoknih antitela u

odnosu na kontrolnu grupu (K), ali ne i na eksperimentalnu grupu 2 (E 2). Procenat mastitisa izazvanih *S. aureus*-om je smanjen sa 53% na 26,6%, pri čemu su dijagnostikovani samo subklinički mastitisi. Prosečan nivo antistafilokoknih antitela u eksperimentalnoj grupi 1 (E 1) je iznosio $0,78 \pm 0,21$, i bio je viši u odnosu na kontrolnu grupu (K) gde je iznosio $0,65 \pm 0,18$. Nivo antistafilokoknih antitela u ovoj grupi tokom celog perioda ogleada je bio niži nego u eksperimentalnoj grupi 2 (E 2). Tokom eksperimenta nije bilo statističke značajnosti u vrednostima nivoa antitela između eksperimentalnih grupa 1 i 2 (E 1 i E 2), sem u četvrtom mesecu od početka ogleada. To je period kada je aplikovana revakcina eksperimentalnoj grupi 2 (E 2). Na osnovu ovih rezultata može da se zaključi da je i ovaj nivo antitela bio dovoljan da spreči pojave novih stafilokoknih infekcija i smanji procenat pojave mastitisa do kraja ogleada. Nickerson (1999) u svom radu je dobio slične rezultate povećanja nivoa antistafilokoknih antitela, i smanjenja pojave stafilokoknih infekcija mlečne žlezde, posle dvokratne aplikacije vakcine pre telenja. Rezultati Changa (2008) pokazuju značajan uspeh rekombinantne stafilokokne vakcine u smanjenju kliničkih i subkliničkih mastitisa krava. Eksperiment je urađen na samo 6 krava (3 kontrolne i 3 eksperimentalne), kojima je aplikovana vakcina tri puta pred očekivani porođaj, a 4 nedelje kasnije je pokušana veštačka infekcija. Kod sve 3 krave iz kontrolne grupe dijagnostikovano je subklinički mastitis, za razliku od vakcinisanih krava gde je nivo antistafilokoknih antitela bio dovoljan da zaštiti vime od infekcije. Slične rezultate opisao je i Pellegrino (2007) u svom radu, gde je nivo antistafilokoknih antitela bio značajno visok i obezbedio je period neinficiranosti vimena u fazi najveće mlečnosti, posle dvokratne aplikacije vakcine pre očekivanog porođaja.

Kod eksperimentalnih grupa 1 i 2 (E 1 i E 2) nivo antistreptokoknih antitela značajno je povećan u odnosu na kontrolnu grupu (K). Nivo antitela kontrolne grupe (K) iznosio je $0,57 \pm 0,39$ OD, eksperimentalne grupe jedan (E 1) $1,00 \pm 0,58$, a eksperimentane grupe dva (E 2) $1,11 \pm 0,64$ OD. Streptokokni mastitisi nisu dijagnostikovani ni kod jedne grupe u ogleadu, za razliku od kontrolne grupe gde je dijagnostikovano subklinički mastitis kod 13,3% krava. Vakcina koja je aplikovana 45 dana pre i 60 dana posle partusa pokazala je značajno povećanje antistafilokoknih i antistreptokoknih antitela kod kunića. Ovi rezultati Ahmada (2008) ukazuju na mogućnost da ova bivalentna vakcina smanji pojavu kliničkih i subkliničkih mastitisa

izazvanih *S. aureus*-om i *Str. agalactiae*. Abubakar (2006) ukazuje na značajno povećanje nivoa antistreptokoknih antitela kod kunića posle dvokratne vakcinacije u odnosu na jednokratnu aplikaciju vakcine, koja je pripremljena od inaktivisane bakterijske ćelije *Str. agalactiae*.

Nije zabeležena statistička značajnost u nivou antistafilokoknih i antistreptokoknih antitela u mleku tokom trajanja ogleda, mada dobijeni rezultati ukazuju na veći nivo antistafilokoknih i antistreptokoknih antitela u mleku eksperimentalne grupe 2 (E 2) (vakcina aplikovana mesec dana pred očekivani porođaj, a revakcina dva meseca posle porođaja), u odnosu na eksperimentalnu grupu 1 (E 1), tokom celog perioda ogleda, što daje prednost ovog načina vakcinacije u odnosu na ostale.

Literaturni podaci ukazuju na jako niske vrednosti specifičnih antistafilokoknih antitela kod nevakcinisanih krava (Middleton 2009), za razliku od vrednosti antitela kod kontrolne grupe u izvedenom eksperimentu, koje su bile visoke. Iz tih razloga izvršena je analiza specifičnih antistafilokoknih i antistreptokoknih antitela u mleku deset prvotelkinja. Titar antitela u mleku prvotelkinja koje nisu primile vakcinu je korišćen kao osnovna vrednost za poređenje sa titrom kod oglednih krava iz eksperimenta. Srednja vrednost somatskih ćelija u mleku prvotelkinja iznosila je 104.440 ± 50.964 , koncentracija specifičnih antitela u mleku na *S. aureus* $0,127 \pm 0,0048$ OD, a koncentracija specifičnih antitela na *Str. agalactiae* u mleku $0,138 \pm 0,0043$ OD. Ove vrednosti broja somatskih ćelija, kao i koncentracija antitela u mleku prvotelkinja koje nisu primile vakcinu, korišćene su kao osnovne vrednosti ispravnosti urađenih testova za poređenje sa eksperimentalnim kravama u ogledu, koje su se tokom života imunizovale na ispitivane mikroorganizme, i kod kojih je titar antistafilokoknih antitela iznosio $0,65 \pm 0,18$ OD, a titar antistreptokoknih antitela $0,57 \pm 0,39$ OD.

ELISA testovi za ispitivanje antistafilokoknih i antistreptokoknih antitela u mleku, pripremani su na osnovu opisa pripreme sličnih testova u literaturi. U pripremi testa korišćene su inaktivisane cele bakterijske ćelije *S. aureus* i *Str. agalactiae*. Rezultati titra antitela pripremljenog ELISA testa za ispitivanje antistafilokoknih antitela u mleku, upoređivani su sa standardnim ELISA testom proizvođača VMRD, USA. Dobijeni rezultati su se poklapali i nije bilo statističke značajnosti u dobijenim vrednostima titra antistafilokoknih antitela u mleku između oba testa.

Nivo antistreptokoknih antitela kod primene rekombinantnih vakcina koje su pripremane od delova bakterijskog zida, odnosno imunogenog proteina (Sip), određivan je ELISA testom (Xu 2011, Rainard 1995). Mogućnost poređenja sa standardnim ELISA testom za ispitivanje antistreptokoknih antitela u mleku u izvedenom eksperimentu nije postojala, ali je na osnovu iskustva sa testom koji je pripreman za ispitivanje antistafilokoknih antitela u mleku, pripremljen i ovaj test. Po završetku određivanja antistreptokoknih antitela ELISA testom i posle statističke obrade podataka, konstatovani su određeni nedostaci u vidu visoke vrednosti koeficijenta varijacije, koji je iznosio preko 30%. Na osnovu toga se pretpostavlja da ELISA test koji je pripreman za ispitivanje antistreptokoknih antitela u mleku nije dovoljno osetljiv. Određivanje nivoa antistreptokoknih antitela posle aplikacije vakcine koja je pripremljena od celih bakterijskih ćelija, pored ELISA testa može da se odredi i pomoću testa indirektno hemaglutinacije (Avais, 2007; Ahmad, 2008; Abubakar, 2006), koja je možda osetljivija za ovakav način aplikacija celocelijskih vakcina. Na osnovu literaturnih podataka, i indirektna hemaglutinacija je, u slučaju aplikacije celocelijskih vakcina, pogodna metoda za određivanje nivoa antistreptokoknih antitela. Kod primene rekombinantnih vakcina koje su pripremane od delova bakterijskog zida, imunogenog proteina (Sip), nivo antistreptokoknih antitela određivan je ELISA testom (Xu 2011, Rainard 1995). Svakako da je u sledećim istraživanjima potrebno otkloniti uočene nedostatke, u cilju postizanja veće osetljivosti testa.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata postignutih u radu mogu da se izvedu sledeći zaključci:

1. Primena vakcine pripremljene od autohtonih sojeva *S. aureus* SAU 7 i *Str. agalactiae* SAG 3, protiv uzročnika mastitisa goveda (*Staphylococcus aureus* i *Streptococcus agalactiae*), ne dovodi do poremećaja zdravstvenog stanja, graviditeta i partusa kod vakcinisanih krava.
2. Kod krava koje su vakcinisane dva meseca pre teljenja i revakcinisane mesec dana nakon toga, kao i kod krava koje su vakcinisane mesec dana pre teljenja, a revakcinisane dva meseca posle teljenja, subklinički i klinički mastitisi su se pojavili u manjem procentu u poređenju sa kontrolnom grupom krava.
3. Kod vakcinisanih krava obe ispitivane grupe, broj somatskih ćelija u mleku je tokom celog perioda ispitivanja bio viši nego kod kontrolne grupe krava, ali ova razlika nije bila statistički značajna.
4. Koncentracija antistafilokoknih antitela G klase u mleku krava vakcinisanih mesec dana pre teljenja, a revakcinisanih dva meseca posle teljenja je bila značajno veća u odnosu na vrednosti kod kontrolne grupe prvog, drugog, četvrtog i osmog meseca nakon partusa.
5. Koncentracija antistreptokoknih antitela G klase u mleku krava vakcinisanih mesec dana pre teljenja, a revakcinisanih dva meseca posle teljenja je bila značajno veća u odnosu na vrednosti kod kontrolne grupe prvog, trećeg, četvrtog, petog, šestog i osmog meseca.
6. Aktivacija humoralnog imunološkog odgovora kod krava koje su vakcinisane antepartalno, a revakcinisane postpartalno je daleko izraženija nego kod krava koje su vakcinisane i revakcinisane u antepartalnom periodu.

8. SPISAK LITERATURE

1. Abubakar M, Muhammad G, Ibrahim K (2006): Primary and secondary immune response to formalin inactivated *Streptococcus agalactiae* isolates in rabbits. Pakistan Vet. J. 26, 3, 115-117.
2. Adams DR (1986): Canine Anatomy a Systemic Study. Ames. Iowa State University Press.
3. Anderson K.L. (1989): Therapy for acute coliforms mastitis. Copm.cont.educ. 11, 1125-1133.
4. Avais M, Bilal M, Dhahzad A, Hamees S (2007): Dose Dependent Antibody Response to Composite Formalin-inactivated *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli* in rabbits. International Journal of agriculture Biology. 9. 4. 622-624.
5. Ahmad T, Muhammad G (2008): Evaluation of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* aluminium hydroxide adjuvanted mastitis vaccine in rabbits. Pak. J. Agri.Sci. 45. 2 353-361.
6. Blank IH (1953): Futher observations on factors whith influence the wather content of the Stratum Corneum. J. Investigative Dermatol. 21, 259-271.
7. Bisharat N, Crook DW, Leight J, Harding RM, Wart PN, Coffey TJ, Maiden MC, Peto T, Jones N (2004): Hyper Invasive neonatal group B *streptococcus* has arisen from a bovine ancestor. J. Clin. Microbiol. 42, 2161-2167.
8. Brown MB, Scasserra AE (1990): Antimicrobial resistant in streptococcal species isolated from bovine mammary gland. Am. J. Res. 51, 2015-2020.
9. Boboš S, Vidić Branka (2001): Preventiva i terapija mastitisa. Simpozijum. Mastitis i kvalitet mleka. Vrnjačka Banja.
10. Bojanić Mirjana (2000): Korelacija između promena u mleku i adherencije patogenih mikroorganizama za epitele ćelija mlečne žlezde krave. Doktorska disertacija, Beograd.
11. Boothby JT, et al (1987): Experimental intramammary inoculation with *M. bovis* in vaccinated and unvaccinated cow effection local and systemic antibody response. Can. J. Vet. Res. 51, (1), 121.

12. Bramley AJ (1991): Mastitis - Physiology or pathology? New insights into the pathogenesis of mastitis. *Flem. Vet. J.* 62., 1, 3-11.
13. Brock JH, Steel ED, Reiter B (1975): The effect of intramuscular and intramammary vaccination of cows on antibody levels and resistance to intramammary infection by *Staphylococcus aureus*. *Res. Vet. Sci.* 19 (2), 152-8.
14. Brodeur BR, Boyer M, Charlebois I, Hamel J, Couture C, Riox R, Martin D (2000): Identification of group B *streptococcal* Sip protein, which elicits cross-protective immunity. *Infect. Immun.* 68; 5610-5618.
15. Burrenich CJ, Detilleux, Paape AM, Massart-Lee (2000): Physiological and genetic factors that influence the cow resistance to mastitis, especially during early lactation. Symposium on Immunology of Ruminant mammary Gland. Proceedings, 9-20.
16. Calzolari A, Giraud JA, Rampone H, Odierno L, Giraud A, Frigerio C, Bettera S, Raspanti C, Hernandez J, Wehbe M, Mattea M, Ferrari M, Larriestra A, Nagel R (1997): Field trial of a Vaccine Against Bovine Mastitis. 2. Evaluation in two Commercial Dairy Herds. *J. Dairy Sci.* 80, 854-858.
17. Carter EW, Kerr DE (2003): Optimization of DNA-based vaccination on Cows Using Green Fluorescent protein and Protein A as a Prelude to Immunization Against Staphylococcal mastitis. *J. Dairy Sci.* 86, 1177-1186.
18. Campros M, Godson D, Hughes H, Babink L (1993): The role of Biological Response Modifiers in Disease Control. *J. Dairy Sci.* 76, 2407-2417.
19. Cowie A, Forsyth A, Hart C (1980): Hormonal Control of Lactation. Springer-Verlag; Berlin, Haidelberg, New York.
20. Chen L, Li S, Wang Z, Chang R, Su J, Han B (2012): Protective effect of recombinant staphylococcal enterotoxin A entrapped in polylactic-co-glycollic acid microspheres against *Staphylococcus aureus* infection. *Veterinary Research*, 43, 20-31.
21. Chang BS, Moon JS, Kang H, Kim YI, Lee HK, Kim JD, Lee BS, Koo HC, Park Yh (2008): Protective effect of recombinant staphylococcal enterotoxin type C mutant vaccine against experimental bovine infection by a strain of

- Staphylococcus aureus* isolated from subclinical mastitis in dairy cattle. Vaccine, 26:2081-2091.
22. Cullor JS (1991): The E. coli J5 vaccine: investigating a new tool to combat coliform mastitis. Vet. Med. 86, 838.
 23. Derosa DC, Sordillo L (1997): Efficacy of a bovine *Staphylococcus aureus* vaccine using interleukin-2 as an adjuvant. Zentralbl Veterinarmed. 44, (10), 599-607.
 24. Edinger DB, Tenhagen BA, Baumgartner B, Heuwieser W (2000): Efficacy of a herd specific vaccine against *Staphylococcus aureus* in dairy heifers. International Symposium on Immunology of Ruminant Mammary Gland. Stresa.
 25. Edwards MS, Baker CJ (2001): Group B streptococcal infections, In JS Remington and JO Klein (ed): Infectious diseases of the fetus and the newborn infant. The W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1091-1156.
 26. El-Rashidy AA, Fox LK, Gay MJ (1992): Diagnosis of *Staphylococcus aureus* Intramammary Infection by Detection of specific Antibody Titar in Milk. Journal of Dairy Science 75, 6, 1431-1435.
 27. Farley MM (2001): Group B streptococcal disease in nonpregnant adults. Clin. Infect. Dis. 15, 33, 4, 556-61.
 28. Finlay B (1990): Cell adhesion and invasion mechanisms in microbial pathogenesis. Current Options in Cell Biology, 815-820.
 29. Frey A, Di Canzio J, Zurakowski D (1998): A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. J. Immunol. Methods 221:35-41.
 30. Foster TJ (1991): Potential for vaccination against infection caused by *Staphylococcus aureus*. Vaccine, 9, 221-227.
 31. Fox LK, Adams DS (2000): The ability of enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibody against *Staphylococcus aureus* in milk following experimental intramammary infection. J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public. Health. 47 (7), 517-526.

32. Frerking H (1961): Zur Feststellung von Enterstörungen und Enterentzündungen in Vorzugsmilchbetrieben unter Verwendung geeigneter Laboratoriumsverfahren. Vet.med. Diss. Hanover.
33. Giraud JA, Calzolari A, Rampone H, Rampone A, Giraud A, Bogni C, Larriestra A, Nagel R. (1997): Field Trial of a Vaccine Against Bovine Mastitis. 1. Evaluation in heifers. J. Dairy Sci. 80, 845-853.
34. Grove TM, Jones GM (1992): Use of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Monitor the Control of *Staphylococcus aureus* mastitis. Journal of Dairy Science. 75, 2, 423-434.
35. Gruneth E (1996): Buiatrik. Verlag Schape, Hanover.
36. Guidry AJ, O'Brien CN, Oliver SP, Dowlen HH, Douglass LW (1994): Effect of whole *Staphylococcus aureus* and mode of immunization on bovine opsonizing antibodies. J. Dairy Sci. 77, 10, 2965.
37. Hamann J (2000): Teat tissue resistance mechanisms with special regard to machine milking. Symposium on Immunology of Ruminant mammary Gland, Proceedings, 102-111.
38. Han HR, Pak S, Guidry A (2000): Prevalence of capsular polysaccharide (CP) types of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis milk and protection of *S. aureus* infection in mice with CP vaccine. J. Vet. Med. Sci. 62 (12), 1331-3.
39. Han HR, Park HM (2000): Effects of adjuvants on the immune response of staphylococcal alpha toxin and capsular polysaccharide (CPS) in rabbit. I. Vet. Med. Sci. 62, (3), 237-41.
40. Hancock JT, Salisbury V, Ovejero-Bogliione MC, Cherry R, Hoare C, Eisenthal R, et al. (2002): Antimicrobial properties of milk: dependence on presence of xanthine oxidase and nitrite, Antimicrob Agents Chemother, 46, 3308-3310.
41. Harmon R (1980): Neutrophil leukocyte as a source of lactoferrin in bovine milk. Am. J. Vet. Res. 41, 1603-06.
42. Harris T, Shelver DW, Bohnsack JF, Rubens CE (2003): A novel streptococcal surface protease promotes virulence, resistance to opsonophagocytosis, and cleavage of human fibrinogen. J. Clin. Investig. 111, 61-70.

43. Hibbitt KG, Graven N, Batten EH (2004): Anatomy, Physiology and Immunology of the Udder, in Andrews HA, editor Bovine medicine, diseases and husbandry of cattle. Blackwell Publishing Company, 311-325.
44. Hillerton JE (1988): Summer mastitis-the current position. In Practice 10 (2), 131-137.
45. Hoedemaker M, Korff B (1999): Untersuchungen zum Einsatz einer stallspezifischen Vakzine gegen *Staphylococcus aureus* in einem Milchviehbetrieb. Der praktische Tierarzt, collegium veterinarium XXIX, 68-71.
46. Hogan JS et al. (1995): Effects on an E.coli J 5 vaccine on mild clinical coliform mastitis. J.Dairy Sci. 78 (2), 285.
47. Hu S, Concha C, Lin F, Persson Waller K (2003): Adjuvant effect of ginseng extracts on the immune responses to immunisation against *Staphylococcus aureus* in dairy cattle. Vet. Immunopathol. 10, 91, (1), 29-37.
48. Katić, V.R., Boboš, S., Jurca, J. (1990) Značaj preventivnih mera u suzbijanju mastitisa. *Veterinarski glasnik*, vol. 44, 3-4, 299-308
49. Katić Vera, Stojanović L (1998): Broj somatskih ćelija u funkciji kvaliteta mleka. Radovi sa XII Savetovanja agronoma, veterinara i tehnologa. Arandjelovac, 395-403.
50. Keefe PG (1977): *Streptococcus agalactiae*: A review Can.Vet.J. 38, 429-437.
51. Keskin A, Seyrek-Intas K, Basri Tak H, Tuna B, Yilmazbas G, Ozakin C, Ertas S (2007): Efficiency of Polyvalent Mastitis Vaccine in Lactating Dairy Cows. J. Biol. Environ.Sci. 1, (2), 87-92.
52. Klastrup NO (1985): Bovine mastitis. Definition and guidelines for diagnosis. Kieler Milchw. Forch. 3. 254-260.
53. Kogan G, Uhrin D, Brisson JR, Paoletti LC, Blodgett AE, Kasper DL, Jennings HJ (1996): Structural and immunochemical characterization of the type VIII group B *Streptococcus capsular polysaccharide*. J. Biol. Chem. 271, 8786-8790.
54. Lachenauer CS, Kasper DL, Shimada J, Ichiman Y, Ohtsuka H, Kaku M, Paoletti LC, Ferrieri P, Madoff LC (1999): serotypes VI and VIII predominate

- among group B streptococci isolated from pregnant Japanese women. *J. Infect. Dis.* 179, 1030-1033.
55. Larsson C, Stalhammer-Carlemalm M, Lindahl G (1999): Protection against experimental infection with group B streptococcus by immunization with a bivalent protein vaccine. *Vaccine* 17, 454-458.
 56. Lee C, Wooding FBP, Kemp P (1980): Identification, property, and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry cough secretions, colostrum and milk from normal cows. *J. Dairy Res.* 47, 39-50.
 57. Lee J, O'Brien C, Guidry AJ, Paape MJ, Shafer-Weaver KA, Zhao X (2005): Effect of a trivalent vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis lymphocyte subpopulations, antibody production, and neutrophil phagocytosis. *Can. J. Vet. Res.* 69, (1), 11-18.
 58. Legrand D, Ellass E, Pierce A, Mazurier J (2004): Lactoferrin and host defence: an overview of its immune-modulating and anti-inflammatory properties, *Biomaterials*, 17, 225-229.
 59. Leitner G, Yadlin B, Glickman A, Chaffer M, Saran A (2000): Systemic and local immune response of cows to intramammary infection with *Staphylococcus aureus*. 69, 2, 181-184.
 60. Leitner G, Lubashevsky E, Training Z (2003): *Staphylococcus aureus* vaccine against mastitis in dairy cows composition and evaluation of its immunogenicity in mouse model. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 20, 93, (3-4), 159-67.
 61. Leitner G. et al. (2003): Development of a *Staphylococcus aureus* vaccine against mastitis in dairy cows. II. Field trial. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 20, 93, (3-4), 153-8.
 62. Leitner G, Krifucks O, Kiran M, Balaban N (2011): Vaccine development for the prevention of staphylococcal mastitis in dairy cows. *Veterinary immunology and Immunopathology*, 142, 25-35.
 63. Lindahl G, Stalhammar M, Areschoug T (2005): Surface Protein Of *Streptococcus agalactiae* and Related proteins In Other bacterial Pathogens. *Clin microbial Rev.* 18, (1), 102-127.

64. Loeffler DA, Norcross NL (1987): Use of enzyme-linked immunosorbent assay to measure bovine milk and serum antibodies to alpha toxin , beta toxin, and capsular antigens of *Staphylococcus aureus*. *Veterinary immunology and Immunopathology*, 14, 145-156.
65. Marković B (1982): *Bolesti vimena domaćih životinja*. Naučna knjiga. Beograd.
66. Middleton JR, Luby CD, Adams S (2008): Efficacy of vaccination against staphylococcal mastitis: A review and new data. *Veterinary Microbiol*, 134, 1-2, 192-198.
67. Mihajlović B (1983): *Mikrobiologija I*. Veterinarski fakultet.
68. Miljković Višeslava (1977): *Higijena i tehnologija mleka*. Naučna knjiga. Beograd.
69. Nickerson SC (1985): Immune mechanisms of the bovine udder an overview. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* Jul.1. 187 (1), 41-45.
70. Nickerson SC (1989): Immunological aspects of mammary involution. *J. Dairy Sci.* 72, 6, 1665-1678.
71. Nickerson SC, Nickerson WE, Owens GM, Tomita PW (1999): Vaccinating dairy heifers with a *Staphylococcus aureus* bacterin reduces mastitis at calving. *Large Anim. Pract.* 20, 16-28.
72. Nordhaug ML, Nesse LL, Norcross NL, Gudding R (1994): A Field Trial with an Experimental Vaccine Against *Staphylococcus aureus* Mastitis in Cattle. 1. Clinical Parameters. *J. Dairy Sci.* 77, 1, 267-1275.
73. Nordhaug ML, Nesse LL, Norcross NL, Gudding R (1994): A Field Trial with an Experimental Vaccine Against *Staphylococcus aureus* Mastitis in Cattle. 2. Antibody Response. *J. Dairy Sci.* 77, 176-1284.
74. O'Brien CAN, GuIdry AJ, Fattom A, Shepherd S, Douglass LW, Westhoff DC (2000): Production of antibodies to *Staphylococcus aureus* serotypes 5, 8, and 336 using poly (DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *J. Dairy Sci.* 83 (8), 1758-66.
75. O'Brien CN, Guidry AJ, Douglass LW, Westhoff DC (2001): Immunization with *Staphylococcus aureus* lysate incorporated into microspheres. *J. Dairy Sci.* 84 (8), 1791-9.

76. Oliver SP, Weihuan F, Almeida RA (2000): Lactoferrin is involved in increased adherence of *Streptococcus uberis* to bovine mammary epithelial cells. Symposium on Immunology of Ruminant mammary Gland, Proceedings, 240-246.
77. Olmsted SB Necross (1992): Effect of specific antibody on Adherence of *Staphylococcus aureus* to Bovine Mammary Epithelial Cells. Inf. Immun. 60, 1, 249-256.
78. Opdebeeck, et al. (1988): Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to bovine Udder Epithelial Cell. Veterinary Microbiology, 16, 77-86.
79. Opdebeeck JP, Norcross NL (1985): Antibodies in bovine serum and rectal secretions to capsular antigens of *Staphylococcus aureus*. Am. J. Vet. Res. 46, 7, 1561.
80. Pankey JW (1989): Hygiene of milking time in the prevention of bovine mastitis. Br.Vet. J. 145.5.401-9.
81. Pankey JW, et al. (1984): Uptake of postmilking teat antiseptics. J. Dairy Sci. 67, 1336-1353.
82. Park HY, Fox LK, Hamilton MJ, Davis WC (1992): Bovine mononuclear leukocyte subpopulation in peripheral blood and mammary gland secretion during lactation. J. Dairy Sci. 75, 998-1006.
83. Pavlović V i sar. (2001): Preventiva i terapija mastitisa krava. Simpozijum "Mastitisi i kvalitet mleka", Vrnjačka Banja.
84. Pavlović V, Vakanjac Slobodanka, Pavlović M (1996): Terapija krava u zasušenju. Veterinarski glasnik 50, 5-6, 351-355.
85. Pellegrino M, Giraud, Raspanti C, Nagel R, Odierno L, Primo V, Bogni C (2007): Experimental trial in heifers vaccinated with *Staphylococcus aureus* avirulent mutant against bovine mastitis. Veterinary microbiology 127, 186-190.
86. Perez MM et al. (2009): protection from *Staphylococcus aureus* mastitis associated with poly-N-acetyl β glucosamine specific antibody production using biofilm-embedded bacteria. Vaccine 27. 2379-2386.
87. Prenafeta A, March R, Casais I, Costa L (2010): Study of the humoral immunological response after vaccination with a *Staphylococcus aureus*

- biofilm-embedded bacterin in dairy cows: Possible role of the exopolysaccharide specific antibody production in the protection from *Staphylococcus aureus* induced mastitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 134, 3-4, 208-217.
88. Pillai SR, Kunze E, Sordillo LM, Jayarao BM (2001): Application of differential inflammatory cell count as a tool to monitor udder health. *J. Dairy Sci*, 84,1313-1420.
 89. Pyorala S (2002): Antimicrobial treatment of mastitis-choice of the route of administration and efficacy. *Proceedings of the British Mastitis Conference*, Brockworth, 20-29.
 90. Quinn PJ (2002): *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Blackwell Science Ltd. MPG books Ltd, Cornwall, UK.
 91. Raab W (1990): Skin cleansing in health and disease. *Wien. Med. Wochenschr.* 17 (suppl. 108), 4.
 92. Radostits O, Blood DC, Gay CC (1994): *Veterinary Medicine*, Eight edition, Baillere Tindal, London-Philadelphia-Sydney-Tokio-Toronto, 563-613.
 93. Rainrad P, Poutrel B (1995): Deposition of complement component on *Streptococcus agalactiae* in bovine milk in the absence in inflammation. *Infect. Immun.* 63, 3422-27.
 94. Rainard P, Lautrou Y, Sarradin P, Poutrel B (1991): Protein X of *Streptococcus agalactiae* Induces Opsonic Antibodies in Cows. *Journal of Clinical Microbiology*, 29, 9. 1842-1846.
 95. Reinard JHD (1983): Experimental mastitis with *Escherichia coli*: kinetics of bacteriostatic and bacteriocidal activities. *Ann. Rech. Vet.* 14, 1-11.
 96. Rogerson A, Rosemary KC, Sharpin, William J. Starra (2000): Analytical methods for immunoglobulins IgG1 and IgG2 in milk for colostrums and mastitis diagnosis and detection of adulteration of goat and sheep milk and products. *International Symposium on Immunology of Ruminant mammary Gland*. International Dairy Federation, Stressa 2000.
 97. Roesch M, Doherr M, Scharen W, Schallibaum M, Blum JW (2007): Subclinical mastitis in dairy cows in Swiss organic and conventional production system. *Journal of Dairy Research*, 74, 86-92.

98. Sanchez L, Aranda P, Perez MD, Calvo M (1988): Concentration of lactoferrin and transferrin throughout lactation in cows colostrums and milk. *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, 369, 1005-1008.
99. Sandholm M, Matilla T (1986): Milk N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAGase) as an indicator for bovine mastitis. Symposium on mastitis control and hygienic production of milk. Espoo, Finland, 153-161.
100. Sender G (1986): Threshold value of somatic cell count in udder total milk. Proceedings of Symposium on mastitis control and hygienic production of milk. Espoo, Finland, 147-153.
101. Shepers AJ, Lam TJGM, Schukken YH, Wilmink JBM, Hanekamp WJA (1997): Estimation of Variance Components for Somatic Cell Counts to Determine Thresholds for Uninfected Quarters. *J. Dairy Sci.* 80, 1833-1840.
102. Seiff E (1932): Ueber den Zellgehalt chemisch einwandfreier und physiologisch veränderter Milch. *Med. Diss. Hanover*.
103. Smith KL, Todhunter DA (1985): Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. *J. Dairy Sci.* 68, 1531-1553.
104. Spellerberg B, Rozdzynski E, Martin S, Weber-Heynemann J, Schnitzler N, Luticken R, Podbielski A (1999): Lmb A protein with similarities to the Lral adhesion family, mediates attachment of *Streptococcus agalactiae* to human laminin. *Infect. Immun.* 67, 871-878.
105. Steele JH (1979): *Zoonosis*. CRC press. NC. Florida
106. Stanojević S, Krnjaić D (2001): Gljivični mastitisi goveda. Simpozijum "Mastitis i kvalitet mleka", Vrnjačka Banja.
107. Schuster DE, Charly ME, Rainard P, Paape M (1997): Complement fragment C5a and inflammatory cytokines in neutrophilic recruitment during intramammary infection with *E. coli*. *Infect. Immun.* 65, 3286-92.
108. Schalm OW (1971): *Bovine mastitis*. Philadelphia, USA.
109. Šijački N, Jablan Pantić Olivera, Pantić V (1997): Morfologija domaćih životinja. Beograd, 224-228.
110. Stojanović L, Petrović M, Katić Vera (2001): Značaj mastitisa u proizvodnji mleka. Simpozijum "Mastitis i kvalitet mleka", Vrnjačka Banja.

111. Stojić V, Gvozdić D (2001): Fiziologija i patofiziologija imunosti mlečne žlezde. Simpozijum "Mastitis i kvalitet mleka", Vrnjačka Banja.
112. Stojić V (1999): Fiziologija. Naučna knjiga, Beograd.
113. Suvorov A, Dimitriev A, Ustinovizch I, Schalen C, Totolia A (1997): Molecular analysis of clinical group B streptococcal strains by use of α and β gene probes. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 17. 149-154.
114. Tenhagen BA et al. (2001): Efficacy of a herd-specific vaccine against *Staphylococcus aureus* to prevent post-partum mastitis in dairy heifers. J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med. 48 (10), 601-607.
115. Tempelmans MJ, Plat-Sinnige, Verkaik NJ, van Wamel JB, de Groot N, Acton DS, van Belkum A (2009): Induction of *Staphylococcus aureus*-specific IgA and agglutination potency in milk of cows by mucosal immunisation. Vaccine 27, 4001-4009.
116. Teofanović M (1979): Imunoprofilaksa mastitisa. Zbornik referata II Jugoslovenskog simpozijuma o suzbijanju mastitisa krava radi proizvodnje i poboljšanja kvaliteta mleka. 199.
117. Tizard RI (1996): Veterinary Immunology. ISBN-7216-5772-9.
118. Tyler JW, Cullor JS, Ruffin DC (1993): Immunization and immunotherapy for mastitis. Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract. 9 (3), 537-49.
119. Tyler JW, et al. (1992): Treatment of subclinical mastitis. Vet. Clin. North. Am. Food. Animal. Practis. 8 (1), 17-28.
120. Vakanjac Slobodanka, Pavlović M, Pavlović V, Obrenović Sonja (2008): Immunoprophylaxis *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cows. Acta Veterinaria 58, 2, 221-230.
121. Watson DL, McColl ML, Davies HI (1996): Field trial of a staphylococcal mastitis vaccine in dairy herds: clinical, subclinical and microbiological assessments. AVJ. 447.
122. Watson DL (1992): Vaccination against experimental staphylococcal mastitis in dairy heifers. Research in Veterinary Science. 53, 346-353.
123. Watson DL and Lee GC (1978): Immunity to experimental staphylococcal mastitis comparison of live and killed vaccines. Aust. Vet. J. 54, 374.

124. Wilkinson HW, Eagon RG (1972): Type-specific antigens of group B type Ic streptococci. *Infect. Immun*, 4, 596-604.
125. Yancey RJ (1993): Recent Advances in Bovine Vaccine Technology. *J. Dairy Sci.* 76, 2418.
126. Xu H, Hu C, Gong R, Chen Y, Ren N, Xiao G, Xie Q, Zhang M, Liu Q, Guo A, Chen H (2011): Evaluation of a Novel Chimeric B Cell Epitope-Based Vaccine against Mastitis induced by Either *Streptococcus agalactiae* or *Staphylococcus aureus* in Mice. *Clinical and vaccine immunology*, 18, 6, 893-900.

Biografski podaci

Asistent mr Vladimir Magaš rođen je 19.04.1965. godine u Zemunu, gde je i završio osnovnu školu. Srednje obrazovanje stiče u Beogradu, gde završava i Veterinarski fakultet 1994. godine, odsek veterinarska medicina.

Završio je Jugoslovensku školu ultrazvuka u Kragujevcu 1995. godine, iz oblasti „Primena ultrazvuka u ginekologiji i opstetriciji“. U periodu od 1995. do 1997. godine radi na Veterinarskom fakultetu kao istraživač-saradnik na Katedri za porodiljstvo, sterilitet i v.o., a od kraja 1997. godine, zaposlen je kao asistent-pripravnik na istoj katedri. Odmah po dolasku, aktivno se uključuje u izvođenje redovne, postdiplomske i specijalističke nastave na predmetu, kao i u klinički i naučno-istraživački rad.

Magistarski rad pod naslovom „*Procena maligniteta tumora mlečne žlezde kuja*“ odbranio je 2002. godine.

U zvanje asistenta na Katedri za porodiljstvo, sterilitet i veštačko osemenjavanje je izabran 2003. godine.

Više puta je pohađao naučne, stručne skupove i edukacije vezane za reprodukciju i zdravstvenu zaštitu malih i velikih životinja u Austriji, Mađarskoj, Sloveniji, Grčkoj, Makedoniji, Hrvatskoj, Belgiji, Bosni i Hercegovini.

Objavio preko 70 radova u domaćim i inostranim stručnim časopisima, zbornicima kratkih referata, na domaćim i međunarodnim simpozijumima.

Prilog 1

IZJAVA O AUTORSTVU

Potpisani Magaš Vladimir

Broj upisa:

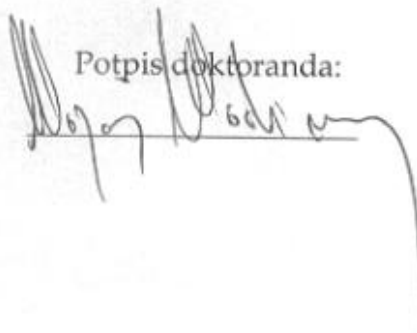
Izjavljujem

Da je doktorska disertacije pod naslovom „Priprema, ispitivanje imunogenosti i ocena efikasnosti vakcine u profilaksi nastanka mastitisa kod krava “

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati konkretno navedeni i
- da nisam kršio autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu,
2012. godine

Potpis doktoranda:



**IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE
DOKTORSKOG RADA**

Ime i Prezime autora: Magaš Vladimir

Broj upisa:

Studijski program: doktorske akademske studije

Naslov rada: Priprema, ispitivanje imunogenosti i ocena efikasnosti vakcine u profilaksi nastanka mastitisa kod krava.

Mentor: Prof. dr Vojislav Pavlović

Potpisani Vladimir Magaš

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao za objavljivanje na portalu Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu,
2012. godine

Potpis doktoranda:


IZJAVA O KORIŠĆENJU

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom „Priprema, ispitivanje imunogenosti i ocena efikasnosti vakcine u profilaksi nastanka mastitisa kod krava“, koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. . Autorstvo - nekomercijalno - bez prerade
4. Autorstvo - nekomercijalno -deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo - bez prerade
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima

U Beogradu,
2012. godine

Potpis doktoranda:
