

Primjena broja somatskih stanica za dijagnostiku mastitisa i utjecaj na kvalitetu mlijeka

Knežević, Klara

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:357423>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-24**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -
Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

Klara Knežević

**PRIMJENA BROJA SOMATSKIH STANICA ZA
DIJAGNOSTIKU MASTITISA I UTJECAJ NA
KVALITETU MLIJEKA**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

VETERINARSKI FAKULTET SVEUČILIŠTA U ZAGREBU

ZAVOD ZA HIGIJENU, TEHNOLOGIJU I SIGURNOST HRANE

Predstojnik:

Izv. prof. dr. sc. Nevijo Zdolec

KLINIKA ZA PORODNIŠTVO I REPRODUKCIJU

Predstojnik:

Prof. dr. sc. Marko Samardžija

Mentori:

Prof. dr. sc. Vesna Dobranić

Izv. prof. dr. sc. Nino Maćešić

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Prof. dr. sc. Marko Samardžija
2. Prof. dr. sc. Vesna Dobranić
3. Izv. prof. dr. sc. Nino Maćešić
4. Doc. dr. sc. Ivan Folnožić (zamjena)

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojim mentorima, prof. dr. sc. Vesni Dobranić i izv. prof. dr. sc. Nini Maćešiću na velikoj pomoći i pristupačnosti te na beskrajnim savjetima koji su mi pomogli u izradi diplomskog rada.

Posebno se zahvaljujem mami Tatjani, sestri Sonji i bratu Hrvoju koji su vjerovali u mene kroz cijelo moje školovanje i bili mi najveća podrška i oslonac. Također, želim se zahvaliti baki i djedu te svim ostalim članovima svoje obitelji na razumijevanju i motivaciji.

Zahvaljujem se i svim svojim prijateljima i prijateljicama, posebno Ani i Jasenki, koji su mi uljepšali cijelo moje školovanje. Hvala vam na podršci, smijehu i sretnim trenucima!

POPIS PRILOGA:

Slika 1. Shematski prikaz građe četvrti

Slika 2. Testator i reagens Zagrebačkog mastitis testa

Slika 3. Slikovni prikaz rezultata ZMT

Tablica 1. Odnos broja somatskih stanica i proizvodnje mlijeka

Tablica 2. Morfološke karakteristike i postoci leukocita u mlijeku različitih vrsta

Tablica 3. Individualni BSS: zdrava, sumnjiva i vjerojatno inficirana krava

Tablica 4. Razvrstavanje mlijeka u razrede sukladno članku 17. Pravilnika o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka

Tablica 5. Varijacije u kvaliteti kravljeg mlijeka u odnosu na BSS

Tablica 6. Dijagramski prikaz različitih čimbenika koji utječu na broj somatskih stanica stadu

Grafikon 1. Broj somatskih stanica tijekom laktacije

Grafikon 2. Utjecaj vitamina E i selena na BSS u različitim vremenskim intervalima tijekom rane laktacije

POPIS KRATICA:

BSS- broj somatskih stanica

IMI- intramamarna infekcija

ECT- *electrical conductivity test*

CMT- *California mastitis test*

ZMT- Zagrebački mastitis test

DMSCC- *Direct microscopic somatic cell count*

SNF- *solids nonfat*

Sadržaj

1. UVOD	1
2. MLIJEČNA ŽLIJEZDA.....	2
2.1. Laktacija krava.....	3
3. MASTITIS	4
3.1. Čimbenici razvoja mastitisa.....	4
3.2. Uzročnici mastitisa.....	5
3.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	5
3.2.2. <i>Streptococcus agalactiae</i>	5
3.2.3. Uvjetovani uzročnici	6
3.3. Podjela mastitisa	6
3.4. Ekonomski značaj	7
4. SOMATSKE STANICE	8
4.1. Epitelne stanice	8
4.2. Leukociti	8
5. DIJAGNOSTIKA I MONITORING MASTITISA	11
5.1. Broj somatskih stanica	11
5.2. Neizravne metode određivanja broja somatskih stanica.....	11
5.2.1. Zagrebački mastitis test	12
5.3. Izravna metoda određivanja broja somatskih stanica	14
5.4. Analiza broja somatskih stanica.....	14
6. ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA BSS.....	16
7. MLIJEKO.....	18
7.1. Mliječna mast.....	18
7.2. Mliječne bjelančevine	18
7.3. Mliječni šećer.....	19
7.4. Kakvoća i higijenski standardi mlijeka.....	19

8. RASPRAVA.....	21
8.1. Utjecaj mastitisa na sastav i osobine mlijeka.....	21
8.2. Utjecaj mastitisa na preradu mlijeka.....	22
8.3. Utjecaj somatskih stanica na zdravlje ljudi.....	23
8.4. Metode snižavanja broja somatskih stanica.....	24
9. ZAKLJUČCI.....	26
10. LITERATURA.....	27
11. SAŽETAK.....	32
12. SUMMARY	33
13. ŽIVOTOPIS	34

1. UVOD

Mlijeko pripada skupini nezamjenjivih namirnica jer je za mlade sisavce prva hrana koja potom postaje važna namirnica tijekom cijelog života. Ono je sekret mliječne žlijezde. Stvara se iz specifičnih sastojaka koje prelaze iz krvi u mliječnu žlijezdu. Kroz krvožilni sustav vimena mora procirkulirati 500l krvi za proizvodnju jedne litre mlijeka (BAČIĆ, 2009.). Mliječna žlijezda osigurava prehranu mladunčadi, no danas krave proizvode mnogo više mlijeka nego što mladunče može konzumirati.

Znatno povećanje mliječnosti utječe na porast stresa mliječnih krava, što može pogodovati razvoju mastitisa. Mastitis je upalna reakcija organizma. Uzrokuju ga brojni patogeni agensi koji ulaze kroz sisni kanal i umnažaju se u sisnoj cisterni. Neki od najvažnijih uzročnika mastitisa su *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Mycoplasma spp.* i *Escherichia coli* (CALVINHO i TIRANTE, 2005., CARRILLO-CASAS i MORALES, 2012.). *S. aureus* je najčešći patogen izoliran iz mliječne žlijezde koji uzrokuje zdravstvene probleme ljudi (BENIĆ, 2018.). Identifikacija uzročnika mastitisa važna je kako bi se poduzele potrebne mjere koje bi smanjile rizik od širenja bolesti i pojave kroničnih oblika te provelo ciljano liječenje. Broj somatskih stanica (BSS) u mlijeku desetljećima se koristi kao praktičan i jednostavan način utvrđivanja mastitisa. Mliječna žlijezda se smatra zdravom ukoliko je BSS manji od 200 000/ml. Broj somatskih stanica koristi se i kao važan parametar kvalitete mlijeka. BSS se povećava uslijed povećane propusnosti krvnih žila vimena te prelaska iona, proteina i upalnih stanica u mlijeko (DILLON, 2012.).

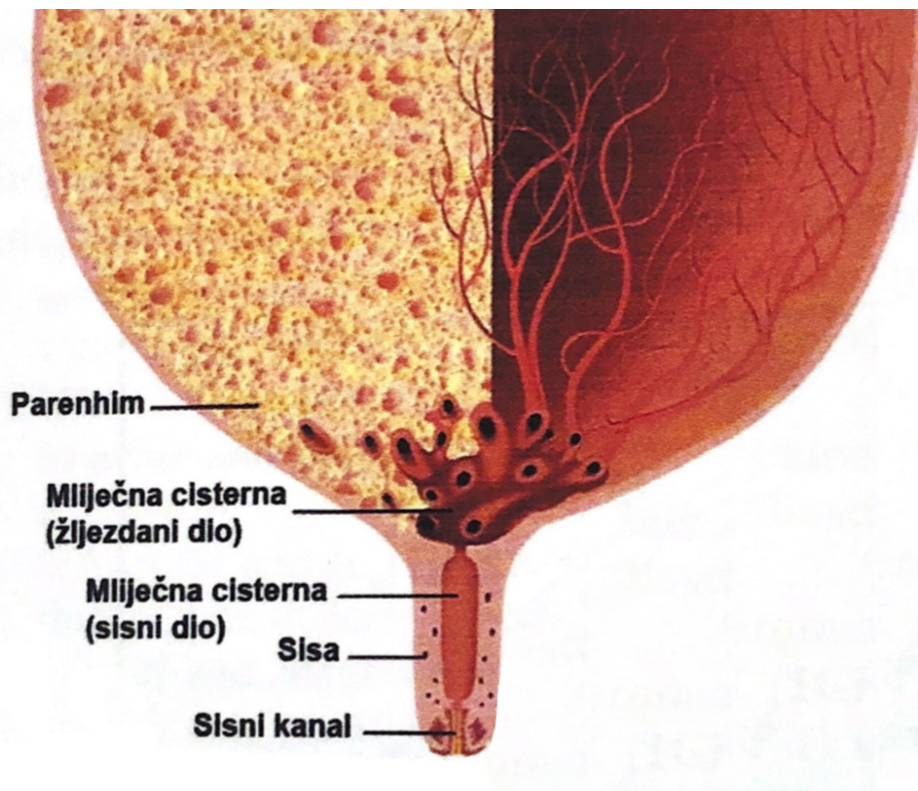
Mastitis utječe na dobrobit životinja i sigurnost hrane, ali uzrokuje i najveće ekonomske gubitke u modernom mliječnom govedarstvu. Ekonomski gubici očituju se kroz smanjenu mliječnost, vrijednost odbačenog mlijeka, smanjenu plodnost te troškove liječenja i veterinara. Svi nabrojani čimbenici direktno utječu na dohodovnost farme (BAČIĆ, 2009.).

Prioritet mliječne industrije je smanjenje mastitisa i proizvodnja visokokvalitetnog mlijeka kako bi bili konkurentni na globalnom tržištu.

2. MLIJEČNA ŽLIJEZDA

Mliječna žlijezda ili vime je specijalizirana kožna žlijezda u kojoj se stvara mlijeko. Sastoji se od četiri odvojene sekretorne žlijezde ili četvrti. Suspenzorni ligament dijeli vime na lijevu i desnu polovicu, a fibrozna opna na prednju i stražnju. Mlijeko i mikroorganizmi ne mogu prelaziti iz jedne četvrti u drugu, pa kada je mastitis prisutan u jednoj četvrti ostale tri mogu biti zdrave.

Četvrt se sastoji od sise, sisne cisterne, žljezdane cisterne, mliječnih kanalića i sekretornog tkiva. Sekretorno tkivo predstavlja funkcionalni dio mliječne žlijezde. Sastoji se od velikog broja alveola koje proizvode mlijeko. Mlijeko se putem mliječnih kanalića spušta u žljezdanu i zatim sisnu cisternu, a istječe kroz sisni kanal (BAČIĆ, 2009.). Sisni kanal također je i mjesto ulaska mikroorganizama u vime te stoga prva linija obrane organizma. Dugačak je 8 do 15 mm, a kada je otvoren širok je 0.5 do 2mm. Mišići sfinktera zatvaraju sisni kanal kako bi spriječili ulazak mikroorganizama (SANDHOLM, 1995., DILLON, 2012.). Širi sisni kanal skraćuje vrijeme potrebno za mužnju, ali predstavlja povećani rizik od spontanog istjecanja mlijeka i učestalosti mastitisa (LEE i CHOUDHARY, 2006; TÄNAVOTS i sur., 2015., BENIĆ i sur., 2018.).



Slika 1. Shematski prikaz građe četvrti (BAČIĆ, 2009.)

Unutrašnjoj sisnog kanala obložena je slojevima keratina koji pomaže sisnom kanalu da se zatvori kada mlijeko ne istječe. Također, keratinski sloj adsorbira mikroorganizme i sprječava njihov ulazak u mliječnu cisternu. Tijekom svake mužnje se određeni broj keratinskih stanica, zajedno s mikroorganizmima, odljušti. Tijekom suhostaja keratin se nakuplja i stvara se keratinski čep te tako štiti vime od mikroorganizama izvana (BAČIĆ, 2009.).

2.1. Laktacija krava

Laktacija krava je fiziološki proces proizvodnje mlijeka. U mliječnim pasmina krava optimalno trajanje laktacije iznosi 305 dana, tj. 10 mjeseci. Nakon laktacije počinje razdoblje suhostaja u trajanju od 51 do 60 dana, tj. 2 mjeseca. U razdoblju suhostaja krava se priprema za predstojeće teljenje i novu laktaciju (TOMAŠKOVIĆ i sur., 2007.).

Estrogen i progesteron imaju inhibicijski učinak na izlučivanje mlijeka. Pred kraj graviditeta dolazi do pada njihove koncentracije i posljedično porasta hormona prolaktina u krvi. Prolaktin, hormon adenohipofize, potiče laktogenezu i izlučivanje mlijeka. Količina izlučenog mlijeka naglo raste u prvim danima laktacije, a vrhunac doseže 1-2 mjeseca nakon poroda. Porast količine izlučenog mlijeka posljedica je proliferacije sekretornih stanica mliječnih alveola i njihove povećane aktivnosti. Nakon vrhunca laktacije, slijedi postupni pad proizvodnje mlijeka, kao rezultat smanjenja broja sekretornih stanica i njihove aktivnosti (PARK i LINDBERG, 2004.).

3. MASTITIS

Mastitis je upalna reakcija organizma krave na infekciju sekretornog dijela mliječne žlijezde. Potrebno ga je razlikovati od intramamarne infekcije (IMI) koja ne zahvaća sekretorni dio. Vime krave je u neprekidnom kontaktu s raznim mikroorganizmima te mnogi čimbenici utječu na to hoće li doći do mastitisa (BAČIĆ, 2009.).

3.1. Čimbenici razvoja mastitisa

Čimbenici se mogu promatrati na razini četvrti, krave i stada. Utvrđena je povezanost anatomske položaja četvrti, oštećenja kože vimena, zdravstvenog stanja sisnog kanala i udaljenosti vrha sise od površine poda sa čimbenicima rizika na razini četvrti (GUARÍN i sur., 2017., BENIĆ i sur., 2018.).

Čistoća vimena i sisa smanjuje rizik od infekcije uvjetovanim uzročnicima mastitisa i skraćuje vrijeme čišćenja vimena prije svake mužnje. Vime pravilne građe manje je sklono infekcijama. Visoko i plitko vime ima manji rizik od ozljeda i ostaje čišće te ima dovoljno prostora za ispravno postavljanje muzne jedinice. Dobro izraženi žlijeb, koji dijeli vime u dvije jednake polovice, znatno će duže održati četvrti i sise u pravilnoj poziciji tijekom budućih laktacija. Na kratkim, uskim i glatkim sisama vjerojatnost skliznuća muznih čaški je veća, a sise koje završavaju šiljasto sklonije su ozljedama vrška sise.

Strojna mužnja razlikuje se od sisanja teladi, a najčešći problem je mužnja na prazno. Događa se kada stroj za mužnju proizvodi vakuum i pulsira, a mlijeko ne istječe iz mliječne žlijezde ili je protok mlijeka tijekom dužeg perioda vrlo slab (manje od 1 lit/min). Prekomjerna mužnja uočava se pred kraj mužnje, kada je protok mlijeka vrlo slab, a muzni stroj nastavlja s mužnjom. U oba slučaja, kao posljedica djelovanja vakuuma, nastaju ozljede sise koje se očituju crvenilom i oteklinama.

Mala količina keratina normalno oblaže sisni kanal i ona se uklanja prilikom strojne mužnje. Kada je nakupljanje keratina pretjerano (*hiperkeratosis*), završetak sisnog kanala postaje hrapav, na njegovoj površini bakterije se lakše naseljavaju i razmnožavaju i takvu sisu je teže dezinficirati prije mužnje (BAČIĆ, 2009.).

Pojedinačni čimbenici rizika za razvoj mastitisa su dob, pasmina, stadij laktacije, razina higijene, proizvodnja i broj somatskih stanica u prethodnoj laktaciji. Mastitis se češće razvija u stariji jedinki, životinja držanih u prljavom okolišu i onih s višim somatskim stanicama u posljednjoj laktaciji (HIITIÖ i sur., 2017., BENIĆ i sur., 2018.).

3.2. Uzročnici mastitisa

Mastitis uzrokuju aerobne i anaerobne bakterije, mikoplazme, kvasci, gljivice, plijesni i alge roda *Prototheca*. Uzročnike mastitisa možemo podijeliti bojanjem po Gramu ili prema etiologiji. Bojanjem po Gramu uzročnici mastitisa dijele se na gram-pozitivne i gram-negativne uzročnike. U skupinu gram-pozitivnih ubrajaju se stafilokoki, streptokoki i enterokoki. Gram-negativni su koliformne bakterije, enterokoki, vrste *Pseudomonas*, *Proteus* i *Serratia spp.* Prema etiologiji, odnosno prema izvorima infekcije i načinu širenja mikroorganizama, uzročnike dijelimo na kontagiozne mikroorganizme i uvjetovane ili mikroorganizme iz okoliša. Najčešći kontagiozni uzročnici mastitisa su *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycobacterium bovis* i *Corynebacterium bovis*, a najčešći uvjetovani uzročnici su koliformne bakterije i streptokoki iz okoliša, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, i *Streptococcus bovis* (BAČIĆ, 2009.).

3.2.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus je najčešće izolirani uzročnik mastitisa u svijetu. Prevalencija infekcije kreće se od 2% do preko 50%. Klinička slika oscilira od povećanog broja somatskih stanica kao jedinog pokazatelja infekcije do gangrenoznih i septikemijskih oblika bolesti. *S. aureus* je vrlo teško iskorijeniti iz stada jer uspješno izbjegava antibiotike nastanjujući se unutar neutrofilnih leukocita i drugih stanica imunološkog sustava te tvorbom mikroapscesa koji sprječavaju mogućnost dolaska antibiotika do bakterija (BENIĆ i sur., 2018.). Mastitis uzrokovan bakterijom *S. aureus* uzrokuje pad proizvodnje mlijeka od 45% po zaraženoj četvrti, što je 15% po životinji (NMC, 1999., CARILLO-CASAS i MORALES, 2012.).

Staphylococcus je česti uzročnik trovanja hranom u svijetu, a u masovnijim napadima trovanja izvori su bili mliječni proizvodi od pasteriziranog i nepasteriziranog mlijeka (BENIĆ i sur., 2012., BENIĆ i sur., 2018.).

3.2.2. *Streptococcus agalactiae*

Do 1960-ih, *Streptococcus agalactiae* smatran je najznačajnijim uzročnikom mastitisa u krava (BENIĆ i sur., 2018.). *S. agalactiae* uzrokuje zarazni mastitis koji se prenosi izravno s krave na kravu tijekom mužnje te uzrokuje iritaciju, oticanje i subklinički mastitis. Danas je

mastitis uzrokovan *S. agalactiae* rijedak zbog poboljšanih preventivnih mjera i upravljanja mužnjom te učinkovitim antibiotskim liječenjem (CARILLO-CASAS i MORALES, 2012.).

3.2.3. Uvjetovani uzročnici

Najčešći uvjetovani uzročnici mastitisa su *E. coli* i *S. uberis*. Žive i umnažaju se u fecesu, stelji, vodi, muhama i bilo kojem drugom prikladnom okolišu. Kontrola mastitisa uvjetovanim uzročnicima osniva se na poboljšanju higijene i pravilnoj ventilaciji prostora.

Bakterija *E. coli* može uzrokovati izrazito tešku kliničku sliku s tvrdim i otečenim vimenom.

S. uberis nalazi se na slamnatoj stelji, infekciju izaziva u krava u suhostaju, a karakterizira ju iznenadan nastup s povišenom tjelesnom temperaturom (DILLON, 2012.).

3.3. Podjela mastitisa

Mastitise dijelimo na osnovu kliničke slike i prema etiologiji razvoja.

Razlikujemo dva oblika kliničke slike mastitisa, subklinički i klinički oblik. Subklinički karakterizira samo blaga upala mliječne žlijezde dok vime i mlijeko izgledaju zdravo. U stadima se javlja češće, a povećani broj somatskih stanica jedini je znak infekcije. Ishod subkliničkog mastitisa je spontano samoizliječenje ili prijelaz u klinički oblik u roku nekoliko sati, dana ili mjeseci. Klinički oblik mastitisa ima jasno vidljive simptome. Promjene mogu biti vidljive na vimenu zaražene krave ili je mlijeko promijenjene konzistencije s vidljivim krpičastim ili vlaknastim tvorbama koje čine nakupine odumrlog epitela, leukocita i bjelančevina. Prema jačini simptoma se klinički mastitis dijeli na blagi, umjereni i teški oblik, te ishodi mogu biti potpuni oporavak, kronični mastitis, gubitak četvrti ili smrt krave (BAČIĆ, 2009.).

Hoće li mastitis biti subklinički ili klinički ovisi o etiologiji uzročnika. Subklinički mastitis s povećanim brojem somatskih stanica uzrokuju gram-pozitivni uzročnici, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, i ostali streptokoki. *E. coli*, gram-negativna bakterija, uzrokuje pojavu kliničkog mastitisa (RUEGG i PANTOJA, 2013.).

3.4. Ekonomski značaj

Mastitis je najznačajniji uzrok ekonomskih gubitaka u modernoj mliječnoj industriji. Gubici se očituju u vidu pada mliječnosti, smanjene kakvoće i higijenske ispravnosti mlijeka, gubitaka premija zbog niže kvalitete mlijeka i niže otkupne cijene. Pad mliječnosti uzrokovan je oštećenjem sektretornog dijela vimena koje postaje zamijenjeno ožiljkastim tkivom i neupotrebljivo za daljnje izlučivanje mlijeka. Tablica 1. prikazuje da udvostručenje BSS-a smanjuje proizvodnju mlijeka za 2%. Dodatni troškovi na farmi obuhvaćaju troškove lijekova i veterinarskih usluga (BAČIĆ, 2009.)

Tablica 1. Odnos broja somatskih stanica i proizvodnje mlijeka (BAČIĆ, 2009.)

Somatske stanice (1000/ml)	Godišnja proizvodnja mlijeka/litara
50	9000
100	8820
200	8640
400	8460
800	8280
1600	8100

4. SOMATSKE STANICE

Mlijeko proizvode epitelne stanice mliječne žlijezde koje su obložene krvnim žilama. Iz krvi uzimaju razne prekursore mlijeka te tako sintetiziraju i otpuštaju mlijeko u lumen žlijezde (ALHUSSIEN i DANG, 2018.). Somatske stanice čine epitelne stanice i leukociti, tj. neutrofili, makrofagi, limfociti i eritrociti. Epitelne stanice se luče u mlijeko iz žljezdane sluznice, a leukociti ulaze u mliječnu žlijezdu kao odgovor na infekciju ili ozljedu (SHARMA i sur., 2011.).

4.1. Epitelne stanice

Epitelne stanice u mlijeku mogu se podijeliti u skupinu nevakuoliranih i vakuoliranih stanica. Nevakuolirane epitelne stanice su različite veličine i obično manje od vakuoliranih. Jezgre su im velike, sferičnog ili eliptičnog oblika, a citoplazma im nije granulirana i ne sadrži masne kapljice (SCHALM i SUR., 1971., DOBRANIĆ, 2006.). Vakuolirane epitelne stanice imaju velike jezgre sferičnog, eliptičnog ili nepravilnog oblika. Količina citoplazme se mijenja, a sadrže različit broj masnih vakuola u jezgri ili im je jezgra dezintegrirana u više manjih granula u citoplazmi (DOBRANIĆ, 2006.). Tijekom infekcije normalan broj epitelnih stanica se povećava.

4.2. Leukociti

Bijele krvne stanice služe kao obrambeni mehanizam za borbu protiv infekcije i pomoć u oporavku oštećenog tkiva. Najveći porast broja somatskih stanica posljedica je priljeva neutrofila, preko 90% (MILLER i PAAPE, 1985., HARMON, 1994., SHARMA i sur., 2011.). Leukociti čine približno 25% somatskih stanica u zdravom mlijeku. Funkcija im je da otkriju i fagocitiraju patogene te pokrenu odgovarajući imunološki odgovor. Na početku infekcije, makrofagi i epitelne stanice mliječne žlijezde sintetiziraju i oslobađaju različite proupalne citokine kao što su tumor *necrosis factor-alpha*, *interleukin-1* i *interleukin-8*. Oni induciraju kemotaksiju neutrofila iz okolnih krvnih žila u mliječnu žlijezdu. Limfociti koordiniraju odgovor imunološkog sustava oslobađanjem citokina, dok neutrofili i makrofagi fagocitiraju i uništavaju bakterije (ALHUSSIEN i sur., 2015., ALHUSSIEN i DANG, 2018.).

Tablica 2. Morfološke karakteristike i postoci leukocita u mlijeku različitih vrsta

parametri	NEUTROFILI	MAKROFAGI	LIMFOCITI	reference
morfološke karakteristike	Promjer 12-15µm	Promjer 20-30 µm	Promjer 9-16 µm	LI i sur., 2014., ALHUSSIEN i sur., 2015., ALHUSSIEN i DANG, 2018.
	Višeslojna jezgra	Najveće stanice u mlijeku	Okrugla jezgra s malo citoplazme	
leukociti u mlijeku izraženi u %				
Mlijeko zdrave krave	19	66*	15	AHUSSIEN i sur., 2016., ALHUSSIEN i DANG, 2018.
Mlijeko krave s mastitisom	75*	17	8	
Mlijeko zdravog bizona	17	35	46*	DANG i sur., 2007., ALHUSSIEN i DANG, 2018.
Mlijeko bizona s mastitisom	67*	18	7	
Mlijeko zdrave ovce	31	57*	8	MORGANTE i sur., 1996., ALHUSSIEN i DANG, 2018.
Mlijeko ovce s mastitisom	62*	31	5	
Mlijeko zdrave koze	79*	11	10	BOULAABA i sur., 2011., ALHUSSIEN i DANG, 2018.
Mlijeko koze s mastitisom	?	?	?	
Mlijeko zdrave deve	9	66*	25	HAMED i sur., 2010., ALHUSSIEN i DANG, 2018.
Mlijeko deve s mastitisom	60*	22	18	

*prevladavajući tip stanice

Upalni odgovor odvija se kroz tri faze (SANDHOLM, 1995., DILLON, 2012.):

1. Povećava se propusnost kapilara te se plazma i proteini propuštaju kroz endotelijalne prostore što dovodi do intersticijskog edema. Leukociti se lijepe za endotel.
2. Fagociti migriraju iz cirkulacije na mjesto infekcije.
3. Dolazi do sekvencijalne degeneracije, regeneracije i stvaranja fibroidnog tkiva.

U slučajevima gdje mehanizam obrane vimena prevlada i eliminira infekciju, broj somatskih stanica (BSS) će se vratiti na normalne vrijednosti. Međutim, kada upalni odgovor ne uspije eliminirati patogen, leukociti će se kontinuirano izlučivati u mlijeko, što dovodi do povišenog broja somatskih stanica (DILLON, 2012.).

5. DIJAGNOSTIKA I MONITORING MASTITISA

Dijagnostikom mastitisa otkrivamo inficirane krave i uzročnike koji su izazvali infekciju. Idealan način otkrivanja mastitisa ne postoji, stoga se koriste razne metode koje se prilagođavaju uvjetima na farmi. Metoda dijagnostike mastitisa treba biti jeftina, brza, pouzdana i primjenjiva na farmi. Otkrivanje mastitisa u ranijoj fazi omogućava brže djelovanje i određivanje liječenja (BAČIĆ, 2009.). Dijagnozu kliničkog oblika mastitisa nije teško postaviti, no u slučajevima subkliničkog mastitisa životinje ne pokazuju kliničke znakove i nema uočenih promjena u sastavu mlijeka te je bolest potrebno dijagnosticirati različitim metodama. Subklinički mastitis pogađa oko 25 do 50% mliječnih krava, pa je ekonomski utjecaj subkliničkog mastitisa znatno veći od utjecaja uzrokovanog kliničkim mastitisom (ARGAW, 2016., BENIĆ i sur., 2018.). Do danas su razvijene brojne metode za otkrivanje infekcije mliječnih žlijezda.

Za otkrivanje mastitisa važan je pregled vimena koji uključuje inspekciju i palpaciju, no ova metoda primjenjiva je samo za otkrivanje kliničkog oblika mastitisa (BAČIĆ, 2009.).

Test električne provodljivosti (ECT) mlijeka temelji se na povećanoj koncentraciji klorida prije pojave kliničkih znakova mastitisa. Roboti za mužnju opremljeni su mjeračima električne provodljivosti, rezultati se mjere za svaku četvrt i potom uspoređuju. ECT može pomoći u ranom otkrivanju mastitisa (DILLON, 2012.).

5.1. Broj somatskih stanica

Broj somatskih stanica desetljećima se koristi kao zlatni standard u dijagnostici subkliničkog mastitisa. Može se izmjeriti izravnim ili neizravnim metodama. Uzorke mlijeka za mjerenje broja somatskih stanica treba uzeti neposredno prije mužnje, nakon odbacivanja prva tri mlaza mlijeka (LAM, 2009., DILLON, 2012.). Uzorci za određivanje BSS prikupljaju se iz čistih sisa.

5.2. Neizravne metode određivanja broja somatskih stanica

California mastitis test (CMT) je neizravna, jednostavna, orijentacijska metoda dijagnostike subkliničkog mastitisa čija je glavna namjena orijentacijski izmjeriti broj somatskih stanica procjenom količine DNK u mlijeku. Reagens Na-lauril sulfat otapa stanične membrane, oslobađa se DNA i stvara se gel u kontaktu sa površinski aktivnom tvari.

Viskoznost gela je proporcionalna broju leukocita u mlijeku (VIGUIER, 2009., DILLON, 2012.).

Wisconsin mastitis test (WMT) koristi se na skupnim uzorcima mlijeka (*bulk tank milk*), a određuje se orijentacijski prosječan broj somatskih stanica. Reagens je isti, Na-lauril sulfat, ali se reakcija ne procjenjuje izgledom mješavine nego se mjeri visina gela (DUARTE i sur, 2015.).

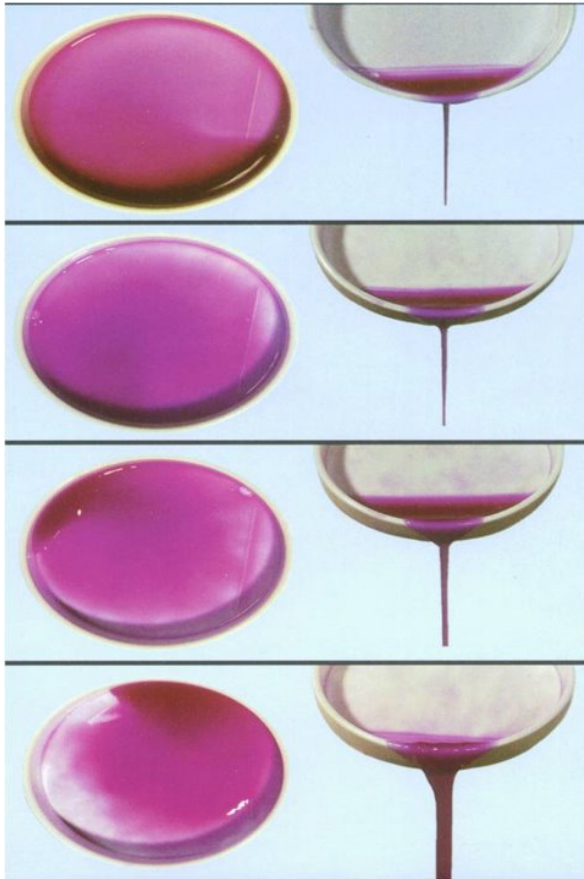
5.2.1. Zagrebački mastitis test

Za provedbu Zagrebačkog mastitis testa koristi se Zagrebački mastitis reagens. To je vodena otopina površinske aktivne tvari (alkilarilsulfonata) i indikatora pH kojeg proizvodi Hrvatski veterinarski institut (BAČIĆ, 2009.).



Slika 2. Testator i reagens Zagrebačkog mastitis testa (<https://veterina.com.hr/?p=51047>)

Zagrebački mastitis test izvodi se u staji pomoću testatora i reagensa te nije potrebna dezinfekcija sisa. Testator ima četiri plitice obilježene rimskim brojevima I, II, III i IV koje označavaju svaku četvrt. Mlijeko se iz četvrti izmuže u pojedinu pliticu, izlije se suvišno mlijeko te se umiješa jednaka količina reagensa. Reakcija se izaziva laganim kružnim pokretima.



Slika 3. Slikovni prikaz rezultata ZMT (BAČIĆ, 2009.)

Ukoliko nakon 2 minute mješavina ostane jednolična ili s tankim jasno vidljivim nitima smatra se da je broj leukocita u 1 ml mlijeka do 300 000, reakcija je negativna i vime zdravo. Vidljivi mastitis ocjenjuje se ukoliko nastaje naglo grušanje želatinoznog karaktera koje se daljnjim pokretanjem ne razbija, a broj leukocita je 2 000 000-15 000 000 u 1 ml mlijeka. Ocjena zdravstvenog stanja vimena je latentni ili skriveni mastitis ako nastaju krpičaste tvorbe ili zgrušavanje poput bjelanjka koje se kida na rubovima. Normalna pH reakcija je sivkasto-crvena s tragovima plavog. Izrazito modra mješavina označava pH od 7 ili više i znak je poodmakle laktacijske dobi životinja. Prljavo žućkasta do žuta mješavina označava pristunost bakterija mliječnokiselog vrenja u četvrti vimena i pH od 6.2 ili niže.

Mastitis testom se ne otkriva uzrok upale, nego se ukazuje na prisutnost nepoželjnih čimbenika na osnovi povećanog broja somatskih stanica.

5.3. Izravna metoda određivanja broja somatskih stanica

Metoda izravnog mikroskopskog broja somatskih stanica (DMSCC) je jednostavna i jeftina metoda brojanja različitih vrsta stanica poput limfocita, neutrofila i makrofaga u uzorcima mlijeka. Na odmašćeno mikroskopsko stakalce razmaže se uzorak od 5-10 μL svježeg mlijeka na površinu od 1 cm^2 (1 $\text{cm}\times$ 1 cm) i suši u vodoravnom položaju s 96% etilnim alkoholom 3 minute. Zatim se suši na zraku, odmašćuje ksilenom 10 minuta i ispire sa 60% etilnim alkoholom 3 minute. Nakon toga se opet suši na zraku te se boja metilenskim modrilom 15 minuta, ispire vodom i suši na zraku. Za gledanje i razlikovanje stanica makrovijak mikroskopa je fiksiran, a mikrovijak se podešava s obzirom na potrebe izvedbe metode (DANG i sur., 2008., ALHUSSEIN I DANG, 2018.).

Nedostatak metode izravnog mikroskopskog broja somatskih stanica je mogućnost obojenja artefakata i agregacija stanica. Stoga je razvijen elektronski uređaj za procjenu BSS-a u kojem se koristi vrlo osjetljiva fluorescentna boja, te je analiza preciznija, pouzdanija i brža. Da bi se broj somatskih stanica izračunao elektronskim uređajem, uzorak mlijeka se pomiješa s reagensom koji sadrži fluorescentnu boju te se 12 μL obojenog uzorka pipetira na čip uređaja. Analiza traje od nekoliko sekundi do dvije minute te se broj obojenih somatskih stanica, njihova dimenzija i koncentracija prikazuju na zaslonu uređaja (ALHUSSEIN I DANG, 2018.). Za izravnu metodu broja somatskih stanica koriste se prijenosni automatski brojači stanica praktični za terensku upotrebu ili automatski brojači za laboratorijske uvjete (DUARTE i sur., 2015.)

5.4. Analiza broja somatskih stanica

Broj somatskih stanica određuje se u jednom ml mlijeka. Mlijeko iz neinficirane četvrti obično ima vrijednost BSS-a ispod 100 000/ml mlijeka. U Europi i Sjevernoj Americi granična vrijednost BSS-a iznosi 200 000/ml mlijeka, iako je u SAD-u zakonski postavljena granica na 400 000/ml. U Australiji i Novom Zelandu zakonski je određena granica vrijednosti BSS-a od 250 000/ml, zbog većinski pašnog načina držanja krava tijekom cijele godine.

Tablica 3. Individualni BSS: zdrava, sumnjiva i vjerojatno inficirana krava (BAČIĆ, 2009.).

Uvijek ispod 200 000 (stanica/ml)	Vjerojatno nije inficirana
Jedan rezultat između 200 i 300 000 (stanica/ml)	Moguće da: <ul style="list-style-type: none">• nije inficirana• je inficirana slabije patogenim uzročnikom• je inficirana samo jedna četvrt
Jedan rezultat preko 300 000 ili puno rezultata preko 200 000 (stanica/ml)	Vjerojatno inficirana jedna ili više četvrti ili se oporavlja od prethodne infekcije

Za prikazivanje broja somatskih stanica koriste se mjesečni izvještaj i linearna ocjena. Mjesečni izvještaj omogućuje kontinuirano praćenje zdravlja vimena pojedine krave i praćenje subkliničkih mastitisa. Linearna ocjena (Linear score, SC) koristi se u SAD-u. Vrijednost LS-a od 4,0 odgovara vrijednosti BSS-a od 200 000/ml i koristi se za praktičnu primjenu razlikovanja zdravih i inficiranih krava. Za svaki porast LS-a za 1 udvostručuje se vrijednost BSS-a (BAČIĆ, 2009.).

Osim navedenih metoda, za dijagnostiku mastitisa koriste se još mjerenje enzimske aktivnosti, bakteriološka pretraga i test osjetljivosti na antibiotike (antibiogram).

6. ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA BSS

Mnogo čimbenika utječe na broj somatskih stanica na razini pojedine krave i na razini stada. Sposobnost ispravnog tumačenja broja somatskih stanica ovisi o razumijevanju čimbenika koji mogu utjecati na njihov broj.

Laktacija muznih krava može se podijeliti na ranu, srednju i kasnu, a mliječnost je najveća tijekom rane laktacije te se smanjuje s pomakom. BSS je najviši nakon teljenja, smanjuje se između 25. i 45. dana, a zatim se polako diže tijekom ostatka laktacijskog ciklusa (KENNEDY i sur., 1982., ALHUSSIEN i DANG, 2018.).



Grafikon 1. Broj somatskih stanica tijekom laktacije

Srednja vrijednost BSS-a u mlijeku prve laktacije je veća tijekom rane laktacije ($1,10-1,27 \times 10^5$ stanica/ml), smanjuje se tijekom srednje laktacije ($0,90-0,99 \times 10^5$ stanica/ml), a zatim se neznatno povećava tijekom kasne laktacije ($0,99-1,07 \times 10^5$ stanica/ml) (SINGH i LUDRI, 2000., ALHUSSIEN i DANG, 2018.). Visokomliječne krave imaju bolji urođeni imunološki odgovor tijekom srednje faze laktacije u odnosu na ranu i kasnu laktaciju (MUKHERJEE i sur., 2013., ALHUSSIEN i DANG, 2018.).

U starijih krava povećan je BSS, kao i tijekom estrusa te naglih promjena obroka i načina držanja. Visokomliječne pasmine krava zbog velike fiziološke opterećenosti i smanjene otpornosti organizma pokazuju veću sklonost pojavi mastitisa. U holštajnskih krava BSS je

najviši na početku laktacije. Geografsko područje i godišnje doba su usko povezani s hranidbom. U ljetnom periodu hrana je kvalitetnija, a krave su u boljoj tjelesnoj kondiciji te je BSS je u mlijeku najmanji (HAVRANEK i RUPIC, 2003., ČAČIĆ i sur., 2003.). Pasma također utječe i na oblik vimena. Viseći oblik vimena ima veću učestalost mastitisa u odnosu na vime s dobro povezanim sisama (DANG i sur., 2007., AHLAWAT i sur., 2008., ALHUSSIEN i DANG, 2018.) BSS je uvijek veći kod kraćih sisa koje imaju veći promjer sisnog kanala (SHARMA i sur., 2016., ALHUSSIEN i DANG, 2018). Mlade prvotelkinje proizvode manje mlijeka i imaju niži broj somatskih stanica u mlijeku u usporedbi s kravama koje su se telile više puta (SARAVANAN i sur., 2015., GONÇALVES i sur., 2018., ALHUSSIEN i DANG, 2018.). S povećanjem dobi protelkinja raste i broj BSS-a u mlijeku. (SCHULTZ i sur., 1990., ČAČIĆ i sur., 2003.). Gubitak tjelesne težine tijekom rane faze laktacije utječe na smanjenje BSS-a, a povećanje tjelesne težine utječe na povećanje BSS-a. Također, veća varijabilnost tjelesne težine utječe na veću vjerojatnost razvoja kliničkog oblika mastitisa.

BSS je veći u mlijeku ručno pomuženih krava u usporedbi sa strojnom mužnjom. Također, umakanje sise u antimikrobno sredstvo smanjuje BSS-a u mlijeku tijekom sljedećih mužnji. Moderni strojevi imaju ugrađene brojače somatskih stanica. BSS 48 mjeseci nakon instalacije je uspoređen s BSS 24 mjeseca prije instalacije (CASTRO i sur., 2015., ALHUSSIEN i DANG, 2018.). BSS je rastao do 12 mjeseci nakon instalacije modernih strojeva, no vremenom se smanjivao, te je 36 mjeseci nakon instalacije BSS bio manji nego prije. Automatska mužnja ima negativan utjecaj na kvalitetu mlijeka tijekom rane faze, no nakon faze prilagodbe, koja u prosjeku traje 188,5 dana (CASTRO i sur., 2017., ALHUSSIEN i DANG, 2018.) kvaliteta mlijeka se značajno poboljša.

7. MLIJEKO

Mlijeko je biološka tekućina vrlo složena sastava žućkastobijele boje, karakterističnog okusa i mirisa. Glavni sastojci mlijeka su voda i suha tvar u koju ubrajamo mliječne masti, mliječne bjelančevine i mliječni šećer (BAČIĆ, 2009). Voda se u mlijeku nalazi u slobodnom obliku i kao vezana za bjelančevine, masti i laktozu. Slobodna voda pri 100°C prelazi u paru. Osim nabrojanog, mlijeko sadrži velik broj antimikrobnih tvari koje sprječavaju nastanak infekcije. Antimikrobne tvari su prisutne u vrlo malim koncentracijama, ali iznimno značajno djeluju na održavanje kakvoće i sigurnosti mlijeka.

7.1. Mliječna mast

Mast se u mlijeku nalazi u vidu kuglica koje se nazivaju masnim kapljicama promjera od 0,1 μm do 22 μm sa prosječnom vrijednošću od 1-6 μm. Mliječna mast utječe na aromu, konzistenciju i teksturu mliječnog proizvoda. Predstavlja najvarijabilniji sastojak mlijeka, a prema Pravilniku o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka (NN 27/2017) mora biti najmanje 3%, a najviše 5,5% mliječne masti. Masne kiseline kratkih i srednjedugih lanaca nastaju u mliječnoj žlijezdi iz octene i β-hidroksimaslačne kiseline. Masne kiseline dužih lanaca su podrijetlom iz masnog tkiva ili su krvlju iz jetre prenesene u vime. Od zasićenih masnih kiselina najzastupljenije su miristinjska, palmitinska i stearinska, a od nezasićenih oleinska masna kiselina. Mast se u mlijeku neposredno nakon mužnje nalazi u vidu emulzije, a stajanjem i hlađenjem mlijeka zbog kristalizacije masnih kiselina prelazi u suspenziju.

7.2. Mliječne bjelančevine

Mliječne bjelančevine se u mlijeku nalaze u dva oblika različitog kemijskog sastava: 80% kazein i 20% proteini sirutke. Kazein je najvažnija složena bjelančevina mlijeka, a sintetizira se u stanicama žljezdanog epitela vimena. Sastoji se od frakcija α, β, γ i κ. U mlijeku se nalazi u obliku koloidnih čestica, micela. Proteini sirutke su bjelančevine koje ostanu u mliječnom serumu nakon izdvajanja kazeina. U proteine sirutke se ubrajaju α-laktoglobulin, β-laktoglobulin i albumini krvnog seruma. Prema Pravilniku o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka (NN 27/2017) mora biti najmanje 2,5%, a najviše 4% bjelančevina.

7.3. Mliječni šećer

Laktoza je specifičan proizvod mliječne žlijezde i nalazi se samo u mlijeku. To je disaharid sastavljen od glukoze i galaktoze. Glukoza prelazi direktno iz krvi u stanice mliječne žlijezde, a galaktoza nastaje iz glukoze preko galakto-6-fosfata. Sadržaj laktoze u mlijeku ovisi o zdravstvenom stanju mliječne žlijezde i u krava iznosi 4.7% - 4.9%. Oblici laktoze su α i β koji imaju ista kemijska svojstva, a razlikuju se po konfiguraciji H i OH grupe na prvom ugljikovom atomu (TRATNIK, 1998.).

7.4. Kakvoća i higijenski standardi mlijeka

Za ocjenu kakvoće mlijeka koristi se prirodni sastav mlijeka, te organoleptički nalaz, kvalitativno- kvantitativni sastav bakterijske flore i još čitav niz drugih pokazatelja. Smatra se da na kakvoću mlijeka neposredno utječu zdravlje i način držanja muzara, održavanje načela higijene pri sabiranju u postupku s mlijekom do potrošača, tehničke mogućnosti za čuvanje prirodnog sastava mlijeka i zdravlje osoba koje rukuju s mlijekom (DOBRANIĆ, 2006.).

Svježe pomuženo mlijeko ima dobre uvjete za rast i razvoj mikroorganizama zbog čega se u proizvodnji i preradi koriste visoki higijenski standardi. Unutrašnjost vimena, vanjska površina bradavica na vimenu i njihova neposredna okolina te mužnja i pribor za mužnju su glavni izvori mikroorganizama u mlijeku. Smatra se da mikroorganizmi iz okoline mogu dospjeti u mlijeko s površine sisa i vimena, s ruku muzača i njegove odjeće, iz stroja za mužnju i mljekarske opreme, ako nisu redovito čišćeni i dezinficirani te iz zraka i vode.

Uz sve navedeno, važan parametar zdravstvenog stanja vimena i kakvoće mlijeka je broj somatskih stanica u 1 ml mlijeka.

U Hrvatskoj je Pravilnikom o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka (NN 27/2017) uređeno razvrstavanje mlijeka u razrede prema broju mikroorganizama i broju somatskih stanica. Navedena vrijednost nije gornja fiziološka vrijednost somatskih stanica u zdravoj mliječnoj žlijezdi već proizlazi iz mljekarsko-tehničkih i ekonomskih razloga (HAVRANEK i RUPIC, 2003.).

Tablica 4. Razvrstavanje mlijeka u razrede sukladno članku 17. Pravilnika o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka (NN 27/2017)

Vrsta mlijeka	Razred	Geometrijski prosjek	
		Mikroorganizmi (u 1 ml)	Somatske stanice (u 1 ml)
Mlijeko	I	≤ 100.000	≤ 400.000
	II	> 100.000	> 400.000

8. RASPRAVA

8.1. Utjecaj mastitisa na sastav i osobine mlijeka

Laktoza se sintetizira u Golgijevom aparatu sekretornih stanica mliječne žlijezde pomoću enzima galaktozil transferaze i alfa laktalbumina, a supstrat za sintezu laktoze je glukoza iz krvi. Pri upalnom procesu kroz mliječnu žlijezdu protiče manja količina krvi pa na taj način dolazi i manja količina glukoze što ima za posljedicu smanjenje laktoze. Također, kod mastitisa je oštećeno i tkivo pri čemu dolazi do smanjenja sintetske sposobnosti enzimatskih stanica u sekretornim stanicama. Smanjenje količine laktoze u citosolu dovodi do promjene osmotskog tlaka na staničnoj membrani što ima za posljedicu prelazak iona iz krvi u mlijeko.

Kao rezultat infekcije mliječne žlijezde nastaje smanjenje postotka masti. Naročiti značaj se daje povećanju sadržaja slobodnih masnih kiselina. Mlijeko krava sa mastitisom sadrži veći postotak esterificiranih masnih kiselina (C4-C12), a manji postotak zasićenih masnih kiselina (C16:0-C18:0). Pored promjena na membrani, masne kapljice mlijeka krava sa mastitisom osjetljivije su na spontanu i induciranu lipolizu pa je u takvom mlijeku velika koncentracija slobodnih masnih kiselina.

Ukupna količina proteina u mlijeku pri mastitisu se ne mijenja. Međutim, utvrđeno je smanjenje proteina koji se sintetiziraju u sekretornim stanicama (α -kazein, β -kazein, α -laktoglobulin, β -laktalbumin), a povećavanje proteina porijeklom iz krvi (serum albumini i imunoglobulini). U mlijeku krava sa mastitisom utvrđeno je značajno povećanje parakapa kazeina. Povećanje parakapa kazeina nastaje kao posljedica povećanja aktivnosti proteaza iz leukocita. Mastitisi dovode do promjene odnosa topivog i micelnog kazeina. Mlijeko zdravih krava ima 95% micelnog kazeina, a mlijeko bolesnih 46%. Porast topivog kazeina direktno utječe na sposobnost mlijeka za proizvodnju fermentiranih proizvoda.

Bakterijska infekcija mliječne žlijezde izaziva oštećenje žlijezdanog epitela što se vidi stvaranjem malih prolaza između sekretornih stanica i povećanja permeabiliteta krvnih kapilara. Stoga, Na^+ i Cl^- prelaze u lumen alveola u cilju održavanja osmotskog tlaka, a K^+ se proporcionalno smanjuje. Uslijed povećane propustljivosti krvnih kapilara dolazi do prolaska iona bikarbonata iz krvi u mlijeko, pa se zapaža i promjena pH.

8.2. Utjecaj mastitisa na preradu mlijeka

Promjene u sastavu mlijeka izazvane mastitisima utječu na podobnost mlijeka za tehnološku obradu. Porast proteina sirutke smanjuje termostabilnost mlijeka. Proteini sirutke adsorbirani na miecele kazeina termički obrađenog mlijeka smanjuju njegovu sposobnost podsiravanja i formiranje gruš. Promjene odnosa kazeinskih frakcija kao i pojava parakapa kazeina utječu na formiranje micela kazeina. To za posljedicu im slab randman i lošu kakvoću gruš, koja se očituje u niskoj rentabilnosti pri preradi mlijeka u sir. Produženo je vrijeme podsiravanja mlijeka krava oboljelih od mastitisa, a rok trajanja sireva proizvedenog od takvog mlijeka je smanjen zbog zadržavanja veće količine vode.

Povećanje imunoglobulina u mlijeku kao posljedica odgovara na infekciju mliječne žlijezde utječe na fermentativnu sposobnost mlijeka. Pojedini uzročnici mastitisa mogu izazvati stvaranje antitijela koji reagiraju sa mliječnokiselinskim bakterijama i inhibiraju njihovo razmnožavanje u mlijeku. Termičkom obradom se smanjuje negativno djelovanje veće količine imunoglobulina na fermentativnu sposobnost mlijeka.

Zbog smanjene termostabilnosti, mlijeko krava s mastitisima nije pogodna sirovina za proizvodnju kondenziranog mlijeka, mlijeka u prahu i steriliziranog mlijeka. Pored direktnog utjecaja mastitisa na podobnost mlijeka za preradu, mastitis i indirektno djeluje na kakvoću mlijeka. Pri tome značajno mjesto imaju antibiotici koji se kao rezidue javljaju u mlijeku poslije liječenja bolesnih krava. Nepravilan postupak sa mlijekom krava nakon liječenja može znatno pridonijeti inhibiciji razmnožavanja mliječnokiselih bakterija pri proizvodnji fermentiranih proizvoda. (STOJANOVIĆ i KATIĆ, 1997.).

Tablica 5. Varijacije u kvaliteti kravljeg mlijeka u odnosu na BSS (ALHUSSIEN i sur., 2016., ALHUSSIEN i DANG, 2018.)

SASTAV MLIJEKA	MLIJEKO ZDRAVE KRAVE	MLIJEKO KRAVE SA SUBKLINIČKIM MASTITISOM	MLIJEKO KRAVE S MASTITISOM
BSS (10 ⁵ st/ml)	<2	3-5	>5
Masti (%)	4.32	4.31	4.08
Proteini (%)	3.30	3.34	3.70
Kazein	2.70	2.55	2.25
Proteini sirutke	0.84	1.13	1.35
Albumini seruma	0.17	0.24	0.37
Laktoza (%)	4.84	4.71	4.41
SNF (%)	9.73	9.61	9.35
pH	6.61	6.63	6.80
EC (mS/cm)	5.90	6.01	7.21
Klorid	0.09	0.13	0.16
Natrij	0.05	0.09	0.11
Kalij	0.18	0.16	0.13

8.3. Utjecaj somatskih stanica na zdravlje ljudi

Najveći rizik za ljudsko zdravlje je konzumacija nepasteriziranog ili nepropisno pasteriziranog mlijeka (OLIVER i sur., 2005., SHARMA i sur., 2011.). Održivi patogeni i njihovi toksini mogu se prenijeti izravno na ljude. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, povezana s Johnovom bolesti goveda (paratuberkuloza) i izolirana iz bolesnika s Crohnovom bolešću, može preživjeti neke prihvaćene postupke pasterizacije. Pravilna pasterizacija je vrlo učinkovita u sprečavanju prijenosa održivih patogena iz mlijeka na ljude.

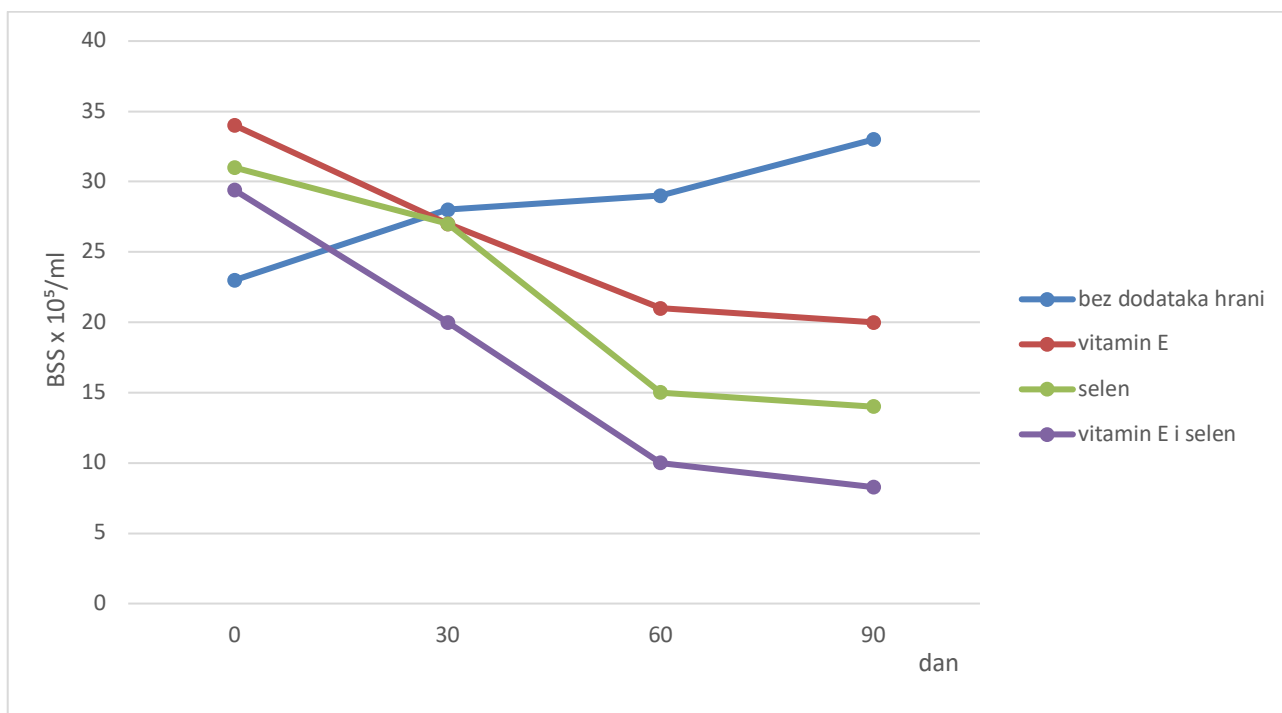
8.4. Metode snižavanja broja somatskih stanica

Mnogi čimbenici i načini upravljanja farmom utječu na povećanje ili smanjenje broja somatskih stanica u mlijeku (SYRIDION i sur., 2012., VISSIO i sur., 2018., ALHUSSIEN i DANG, 2018). Mjere opreza tijekom mužnje, postupaka povezane sa smanjenjem BSS-a u stadu su nošenje rukavica tijekom mužnje, automatske muzilice, dezinfekcija sisa nakon mužnje, redoviti godišnji pregled muznog uređaja i držanje krava da stoje nakon mužnje. Nadalje, slobodan način držanja, upotreba pijeska za stelju, održavanje higijene ležišta nakon poroda, monitoring krava u suhostaju, primjena terapije u suhostaju, redovita primjena mastitis testa doprinose snižavanju broja somatskih stanica.

Tablica 6. Dijagramski prikaz različitih čimbenika koji utječu na broj somatskih stanica stadu (ALHUSSIEN i DANG, 2018.)

ČIMBENICI KOJI POVEĆAVAJU BSS	ČIMBENICI KOJI SMANJUJU BSS
Infekcija/ ozljeda vimena	Zdravo vime/ životinja/ izmuzivač
Dob životinje	Standardna procedura mužnje
Povećanje stupnja laktacije	Higijena okoliša
Nehigijenska/ nedovršena mužnja	Redoviti pregledi vimena
Loše zoohigijenski uvjeti	Hranjenje antioksidansima
Vruća i vlažna klima	Liječenje/ izlučivanje bolesnih životinja
Promjene u hranidbi	Dezinfekcija sise nakon mužnje
Skupno držanje zdravih i bolesnih krava	Terapija u suhostaju
Stres	Genska selekcija

Prehrambeni dodaci s vitaminima i mineralima poboljšavaju imunitet životinje i stoga smanjuju broj somatskih stanica. Upotreba vitamina E (500 IU/životinja/dan) i selen (6 mg/životinji/dan) korišteni zasebno ili u kombinaciji tijekom rane laktacije kroz dva mjeseca smanjuje BSS sa $29,39 \times 10^5$ na $8,28 \times 10^5$ stanica/ml mlijeka (SHARMA i MAITI, 2005., SHARMA i sur., 2011.). Također, korištenje antibiotika prije teljenja učinkovito smanjuje BSS-a iz pojedinih četvrti.



Grafikon 2. Utjecaj vitamina E i selena na BSS u različitim vremenskim intervalima tijekom rane laktacije (SHARMA i MAITI, 2005., SHARMA i sur., 2011.)

Genetsko poboljšanje mliječnosti popraćeno je povećanom genetskom osjetljivošću na mastitis stoga je važno odabirom zdravstvenih svojstava vimena neutralizirati neželjeni genetski efekt osjetljivosti na mastitis (SHOOK, 1993., ROGERS i sur., 1998., SHARMA i sur., 2011.). Korištenjem cjepiva MASTIVAC I smanjuje se broj životinja zaraženih bakterijom *S. aureus*, poboljšava se cjelokupno zdravlje mliječne žlijezde, raste kvaliteta i količina proizvodnje mlijeka te se smanjuje BSS-a (LEITNER i sur., 2004., ALHUSSIEN i DANG, 2018.). Biološkim istraživanjima pod nazivom Omics otkriveno je da su metaboliti poput hipurata i fumarata povezani s nižim BSS-a mlijeka, dok su laktat, butirrat, izoleucin, acetat i β -hidroksibutirat povezani s visokim vrijednostima BSS-a (SUNDEKILDE i sur., 2013., ALHUSSIEN i DANG, 2018.).

9. ZAKLJUČCI

Mastitis je jedan od glavnih problema na farmama mliječnih krava koji uzrokuje najveće ekonomske posljedice.

Mastitis uzrokuje povećanje broja somatskih stanica zbog povećane propusnosti krvnih žila i povećanog ljuštenja epitelnih stanica u mlijeko.

Povećani broj somatskih stanica dovodi do smanjenje postotka mliječne masti i laktoze te povećanje ukupnog broja proteina, izvanstaničnih iona i povećanje električne provodljivosti.

Mlijeko krava s mastitisom ima smanjenu termostabilnost te mu je smanjena sposobnost podsiravanja i formiranja gruš. Takvo mlijeko ima užegli okus i nije pogodno za proizvodnju kondenziranog mlijeka, mlijeka u prahu i steriliziranog mlijeka.

Redovita dezinfekcija sisa vimena prije i poslije mužnje, klinički pregled vimena te povoljni zoohigijenski uvjeti držanja imaju pozitivan učinak na ukupan broj somatskih stanica u mlijeku krava.

10. LITERATURA

1. ANONYMOUS (2017): Pravilnik o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka. Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske. NN 27/2017.
2. AHLAWAT, K., A. K. DANG, C. SINGH (2008): Relationships of teat and udder shape with milk SCC in primiparous and multiparous Sahiwal cows. *Indian J. Dairy Sci.* 61, 152-156.
3. ALHUSSIEN, M., A. K. DANG (2018): Milk somatic cells, factors influencing their release, future prospects and practical utility in dairy animals. *Vet world.* 11, 562-557.
4. ALHUSSIEN, M., M. KAUR, P. MANJARI, S. P. KIMOTHI, A. K. MOHANTY, A. K. DANG (2015): A comparative study on the blood and milk cell counts of healthy, subclinical, and clinical mastitis Karan fries' cows. *Vet. World.* 8, 685–689.
5. ALHUSSIEN, M., P. MANJARI, A. A. SHEIKH, S. M. SEMAN, S. REDDI, A. K. MOHANTY, A. K. DANG (2016): Immunological attributes of blood and milk neutrophils isolated from crossbred cows during different physiological conditions. *Czech J. Anim. Sci.* 61, 223–231.
6. ALHUSSIEN, M., P. MANJARI, S. MOHAMMED, A. A. SHEIKH, S. REDDI, S. DIXIT, A. K. DANG (2016): Incidence of mastitis and activity of milk neutrophils in Tharparkar cows reared under semi-arid conditions. *Trop. Anim. Health Prod.* 48, 1291-1295.
7. ARGAW, A. (2016): Review on epidemiology of clinical and subclinical mastitis on dairy cows. *Food Sci. Qual. Manag.* 52, 56-65.
8. BAČIĆ, G. (2009): Dijagnostika i liječenje mastitisa u goveda. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb. str. 17-43.
9. BENIĆ, M., B. HABRUN, G. KOMPES (2012): Clinical and epidemiological aspects of cow mastitis caused by *S. aureus* and its methicilin-resistant strains. *Rad Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti.* 511 (37), 113-122.
10. BENIĆ, M., N. MAČEŠIĆ, L. CVETNIĆ, B. HABRUN, Ž. CVETNIĆ, R. TURK, D. ĐURIČIĆ, M. LOJKIĆ, V. DOBRANIĆ, H. VALPOTIĆ, J. GRIZELJ, D. GRAČNER, J. GRBAVAC, M. SAMARDŽIJA (2018): Bovine mastitis: a persistent and evolving problem requiring novel approaches for its control - a review. *Vet. Arhiv.* 88 (4), 535-557.
11. BOULAABA, A., N. GRABOWSKI, G. KLEIN (2011): Differential cell count of caprine milk by flow cytometry and microscopy. *Small Rumin. Res.* 97, 117–123.

12. CALVINHO, L. F., L. TIRANTE (2005): Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en Argentina en los últimos 25 años. *Revista FAVE* 4, 29–40.
13. CARRILLO-CASAS, E. M., R. E. MIRANDA-MORALES (2012): Bovine Mastitis Pathogens: Prevalence and Effects on Somatic Cell Count. *Milk Production – An Up-to-Date Overview of Animal Nutrition, Management and Health*. str. 359-364.
14. CASTRO, A., J. M. PEREIRA, C. AMIAMA, M. BARRASA (2017): Long-term variability of bulk milk somatic cell and bacterial counts associated with dairy farms moving from conventional to automatic milking systems. *Ital. J. Anim. Sci.*, 17, 218-225.
15. ČAČIĆ, Z., S. KALIT, N. ANTUNAC, M. ČAČIĆ (2003): Somatske stanice i čimbenici koji utječu na njihov broj u mlijeku. *Mljekarstvo*, 53, 23-36.
16. DANG, A. K., S. KAPILA, P. TOMAR, S. SINGH (2007): Immunity of the buffalo mammary gland during different physiological stages. *Asian Aust. J. Anim. Sci.* 20, 1174–1181.
17. DANG, A. K., S. KAPILA, C. SINGH, J. P. SEHGAL (2008): Milk differential cell counts and compositional changes in cows during different physiological stages. *Milchwissenschaft*, 63, 239-242.
18. DILLON, D. (2012): An Evaluation of traditional, novel and prospective cow-side tests in approach to mastitis diagnosis. Faculty of Veterinary Medicine, Szent Istvan University, Department of Animal Hygiene.
19. DOBRANIĆ, V. (2006): Nalaz i utjecaj gljivica na higijensku kakvoću kravljeg mlijeka. Doktorska disertacija, Veterinarski fakultet, Zagreb.
20. DUARTE, C. M., P. P. FREITAS, R. BEXIGA (2015): Technological advances in bovine mastitis diagnosis: an overview. *J. Vet. Diagn. Investig.* 27, 665-672.
21. GONÇALVES, J. L., R. I. CUE, B. G. BOTARO, J. A. HORST, A. A. VALLOTO, M. V. SANTOS (2018): Milk losses associated with somatic cell counts by parity and stage of lactation. *J. Dairy Sci.*, 80, 3219.
22. GUARÍN, J. F., M. G. PAIXÃO, P. L. RUEGG (2017): Association of anatomical characteristics of teats with quarter-level somatic cell count. *J. Dairy Sci.* 100, 1-10.
23. HAMED, H., A. GARGOUTI, Y. HACHANA, A. EL FEKI (2010): Comparison between somatic cell and leukocyte variations throughout lactation in camel (*Camelus dromedarius*) and cow's milk. *Small Rumin. Res.* 94, 53–57.
24. HARMON, R. J. (1994): Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell count. *J. Dairy Sci.* 77, 2103-2112.

25. HAVRANEK, J., V. RUPIC (2003): Mlijeko od farme do mljekare. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb. str. 29-44.
26. HIITIÖ, H., J. VAKKAMÄKI, H. SIMOJOKI, T. AUTIO, J. JUNNILA, S. PELKONEN, S. PYÖRÄLÄ (2017): Prevalence of subclinical mastitis in Finnish dairy cows: changes during recent decades and impact of cow and herd factors. *Acta Vet. Scand.* 59, 22.
27. KENNEDY, B. W., M. S. SETHAR, A. K. W. TONG, J. E. MOXLEY, B. R. DOWNEY (1982): Environmental factors influencing test-day somatic cell counts in Holsteins. *J. Dairy Sci.* 65, 275-280.
28. LAM, T. J. G. M., R. G. Olde Riekerink, O. C. Sampimon, H. Smith (2009): Mastitis diagnostics and performance monitoring. *Ir. Vet J.* 62, 34-39.
29. LEE, D. H., V. CHOUDHARY (2006): Study on Milkability Traits in Holstein Cows. *Asian-Australas J. Anim. Sci.* 19, 309-314.
30. LEITNER, G., O. KRIFUCKS, A. GLICKMAN, Y. VAADIA, S. FRIEDMAN, E. EZRA, Z. TRAININ (2004): MASTIVAC I: *Staphylococcus aureus* vaccine-prevention of new udder infection and therapeutic effect on cows chronically infected with *S. aureus* under field conditions. *Isr. J. Vet. Med.*, 59, 15-23.
31. LI, N., R. RICHOUX, M. BOUTINAUD, P. MARTIN, V. GAGNAIRE (2014): Role of somatic cells on dairy processes and products: A review. *Dairy Sci. Technol.* 94, 517–538.
32. MILLER, R. H., M. J. PAAPE (1985): Relationship between milk somatic cell count and milk yield. *Proc. Ann. Mtg. Natl. Mastitis Council.* 60.
33. MORGANTE, M., S. RANUCCI, M. PAUSELLI, C. CASOLI, E. DURANTI (1996): Total and differential cell count in milk of primiparous comisana ewes without clinical signs of mastitis. *Small Rumin. Res.* 21, 265–271.
34. MUKHERJEE, J., A. K. DANG (2011): Immune activity of milk leukocytes during early lactation period in high and low yielding crossbred cows. *Milchwissenschaft.* 66, 384-388.
35. MUKHERJEE, J., N. VARSHNEY, M. CHAUDHURY, A. K. MOHANTY, A. K. DANG (2013): Immune response of the mammary gland during different stages of lactation cycle in high versus low yielding Karan Fries crossbred cows. *Livestock Sci.* 154, 215-223.
36. NATIONAL MASTITIS COUNCIL, (1999): Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection. National Mastitis Council. 3rd ed. Arlington, Virginia, USA.
37. OLIVER, S. P., B. M. JAVARAO, R. A. ALMEIDA (2005): Foodborne pathogens, mastitis, milk quality, and dairy food safety. *Proc. 44th NMC Annual Meeting.* Orlando, FL. 3-27.

38. PARK, C. S., G. L. LINDBERG (2004): The Mammary Gland and Lactation. U: Dukes' Physiology of Domestic Animals. 12th ed. (Reece, W. O.). Cornell University Press, Ithaca, London. 720-741.
39. ROGERS, G. W., G. BANOS, U. SANDER NIELSEN, J. PHILIPSSON (1998): Genetic correlations among somatic cell scores, productive life, and type traits from the United States and udder health measures from Denmark and Sweden. J. Dairy Sci. 81, 1445-1453.
40. RUEGG, P. L., J.C.F. PANTOJA (2013): Understanding and using somatic cell counts to improve milk quality. Irish Journal of Agricultural and Food Research 52. 101–117.
41. SANDHOLM, M., T. HONKANEN-BUZALSKI, L. KAARTINEN, S. PYÖRÄLÄ (1995): The bovine udder and mastitis. Gummerus, Jyväskylä, Finland. 121-141.
42. SARAVANAN, R., D. N. DAS, S. DE, S. PANNEERSELVAM (2015): Effect of season and parity on somatic cell count across zebu and crossbred cattle population. Indian J. Anim. Res. 49, 383-387.
43. SCHALM, O. W., E. J. CARROL, N. C. JAIN (1971): Bovine mastitis. Lea and Febiger, Philadelphia.
44. SCHULTZ, M. M., L. B. HANSEN, G. R. STEUERNAGEL (1990.): Variation of milk, fat, protein and somatic cells for dairy cattle. J. Dairy Sci. 73, 484 – 493.
45. SHARMA, N., N. K. SINGH, M. S. BHADWAL (2011): Relationship of Somatic Cell Count and Mastitis: An Overview. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 3, 429-438.
46. SHARMA, T., D. P. KUMAR, P. R. GHOSH, D. BANERJEE, D. B. CHANDRA, J. MUKHERJEE (2016): Alteration in the *in vitro* activity of milk leukocytes during different par-ity in high yielding cross-bred cows. Biol. Rhythm. Res. 47, 519-527.
47. SHARMA, N., S. K. MAITI (2005): Effect of dietary supplementation of vitamin E and selenium in sub clinical mastitis in dairy cows. Indian J. Vet. Med. 25, 76-79.
48. SINGH, M., R. S. LUDRI (2000): Somatic cell counts in Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*) during different stages of lactation, parity and season. Asian Aust. J. Anim. Sci. 14, 189-192.
49. SHOOK, G. E. (1993): Genetic improvement of mastitis through selection on somatic cell count. Vet. Clin. North Am., Food Anim. Pract. 9, 563-581.
50. STOJANOVIĆ, L., V. KATIĆ (1998): Higijena Mleka. Veterinarski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srbija.
51. SUNDEKILDE, U. K., N. A. POULSEN, L. B. LARSEN, H. C. BERTRAM (2013): Nuclear magnetic resonance metabonomics reveals strong association between milk metabolites and somatic cell count in bovine milk. J. Dairy Sci. 96, 290-299.

52. SYRIDION, D., S. S. LAYEK, K. BEHERA, T. K. MOHANTY, A. KUMARESAN, A. MANIMARAN, A. K. DANG, S. PRASAD (2012): Effects of parity, season, stage of lactation, and milk yield on milk somatic cell count, pH and electrical conductivity in crossbred cows reared under subtropical climatic conditions. *Milchwissenschaft*. 67, 362-365.
53. TÄNAVOTS, A., H. KIIMAN, E. ALTOSAAR, T. KAART, H. VIINALASS (2015): Milk leakage from the udder of cows on dairy farms with automatic and conventional milking system. *Vet. Med. Zoot.* 69, 71-78.
54. TRATNIK, Lj. (1998): Mlijeko - tehnologija, biokemija i mikrobiologija. Zagreb. Hrvatska mljekarska udruga.
55. TOMAŠKOVIĆ, A., Z. MAKEK, T. DOBRANIĆ, M. SAMARDŽIJA (2007): Rasplodivanje krava i junica, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb. 73-79.
56. VIGUIER, C., S. ARORA, N. GILMARTIN, K. WELBECK, R. O'KENNEDY (2009): Current trends and future perspectives. *Cell Press*. 27, 486-490.
57. VISSIO, C., M. BOUMAN, A. J. LARRIESTRA (2018): Milking machine and udder health management factors associated with bulk milk somatic cell count in Uruguayan herds. *Prev. Vet. Med.* 150, 110-116.

11. SAŽETAK

Knežević, K.: Primjena broja somatski stanica za dijagnostiku mastitisa i utjecaj na kvalitetu mlijeka

Mastitis je upalna reakcija organizma na infekciju sekretornog dijela mliječne žlijezde. Uzročnici mastitisa dijele se bojanjem po Gramu na gram-pozitivne i gram-negativne, te prema etiologiji na kontagiozne i uvjetovane uzročnike. Kontagiozni se uzročnici najčešće prenose tijekom mužnje, a uzrokuju dugotrajne, kronične mastitise uglavnom subklinikog tijeka. Za razliku od njih, uvjetovani uzročnici u pravilu izazivaju kratkotrajne infekcije, ali s češćim kliničkim manifestacijama. Inficirane krave se otkrivaju dijagnostikom mastitisa, koja se najčešće provodi neizravnim ili izravnim metodama određivanja broja somatskih stanica i bakteriološkom pretragom mlijeka. Zagrebački mastitis test je brza i jednostavna orijentacijska metoda procjene broja somatskih stanica koja se provodi u terenskim uvjetima. Somatske stanice čine epitelne stanice i leukociti. Normalno se nalaze u mlijeku, ali se njihov broj i odnos mijenja ovisno o upalnim promjenama u mliječnoj žlijezi. Kretanje broja somatskih stanica uglavnom ovisi o pojavi mastitisa, ali i o stadiju laktacije, dobi životinje, godišnjem dobu, ostalim bolestima mliječne krave. Mlijeko sa povećanim brojem somatskih stanica ima promijenjenu kvalitetu u odnosu na mlijeko zdrave krave. Mlijeko sadrži niži udio mliječne masti i laktoze, a povećani je udio proteina. Nadalje, povećana je električna provodljivost zbog povišene koncentracija klora i natrija u mlijeku. Također, ima smanjenu termostabilnost te mu je smanjena sposobnost podsiravanja i formiranja gruš. Takvo mlijeko ima užegli okus i nije pogodno za proizvodnju kondenziranog mlijeka, mlijeka u prahu i steriliziranog mlijeka. Rok trajanja sireva proizvedenog od takvog mlijeka je smanjen zbog zadržavanja veće količine vode. Pravilnim i redovitim provođenjem postupaka dezinfekcije sisa vimena prije i poslije mužnje podiže se prinos i kvaliteta mlijeka, odnosno smanjuju se troškovi liječenja mastitisa i povećava se prihod fame.

Ključne riječi: mastitis, somatske stanice, mlijeko, kakvoća mlijeka

12. SUMMARY

Knežević, K.: Use of somatic cell count for diagnosis of mastitis and impact on milk quality

Mastitis is an inflammatory reaction of the body to an infection of the secretory part of the mammary gland. The causes of mastitis are divided by Gram staining into gram-positive and gram-negative, and according to the etiology into contagious and environmental causes. Contagious pathogens are most transmitted during milking, and cause long-lasting, chronic mastitis of mostly subclinical course. In contrast, environmental pathogens typically cause short-term infections, but with more frequent clinical manifestations. Infected cows are detected by the diagnosis of mastitis, which is most often carried out by indirect or direct methods of determining the number of somatic cells and bacteriological examination of milk. The Zagreb mastitis test is a quick and simple orientation method for estimating the number of somatic cells that is performed in field conditions. Somatic cells are made up of epithelial cells and leukocytes. They are normally found in milk, but their number and ratio change depending on inflammatory changes in the mammary gland. The movement of the number of somatic cells mainly depends on the occurrence of mastitis, but also on the stage of lactation, the age of the animal, the season and other diseases of the dairy cow. Milk with an increased number of somatic cells has an altered quality compared to the milk of a healthy cow. Milk contains a lower proportion of milk fat and lactose, and an increased proportion of protein. Furthermore, electrical conductivity is increased due to elevated concentrations of chlorine and sodium in milk. It also has reduced thermal stability and reduced ability to curdle and form lumps. Such milk has a rancid taste and is not suitable for the production of condensed milk, milk powder and sterilized milk. The shelf life of cheeses produced from such milk is reduced due to the retention of a larger amount of water. Proper and regular disinfection of udder teats before and after milking raises the yield and quality of milk and reduces the cost of mastitis treatment and increases the income of farm.

Key words: mastitis, somatic cells, milk, milk quality

13. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 24. kolovoza 1995. u Zagrebu. Nakon završene osnovne škole Ivan Kozarac u Nijemcima, upisala sam Gimnaziju Matije Antuna Reljkovića u Vinkovcima. Godine 2014. sam upisala Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studiranja sudjelovala sam u raznim studentskih aktivnostima, te sam pohađala stručne seminare, kongrese i radionice. Aktivno sam radila brojne poslove preko Student servisa.