



**УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ ВО СКОПЈЕ
ФАКУЛТЕТ ЗА ЗЕМЈОДЕЛСКИ НАУКИ И ХРАНА -
СКОПЈЕ**



М-р ДИМИТАР Д. НАКОВ

**ИСПИТУВАЊЕ НА ПОВРЗАНОСТА МЕЃУ ОКСИДАТИВНИОТ
СТРЕС И МАСТИТОТ КАЈ МЛЕЧНИ КРАВИ ВО РАНА
ЛАКТАЦИЈА**

- ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА -

Скопје, 2015 година

**УНИВЕРЗИТЕТ „Св. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ ВО СКОПЈЕ
ФАКУЛТЕТ ЗА ЗЕМЈОДЕЛСКИ НАУКИ И ХРАНА - СКОПЈЕ**

КОМИСИЈА ЗА ОЦЕНА И ОДБРАНА НА ДОКТОРСКАТА ДИСЕРТАЦИЈА:

МЕНТОР:

**Проф. д-р Методија Б. Трајчев
Факултет за земјоделски науки и храна - Скопје**

ЧЛЕНОВИ НА КОМИСИЈАТА:

**Проф. д-р Жарко Мациров
Факултет за земјоделски науки и храна - Скопје**

**Проф. д-р Милена Петровска
Медицински факултет - Скопје**

**Проф. д-р Ицко Ѓоргоски
Природно-математички факултет - Скопје**

**Проф. д-р Сретен Андонов
Факултет за земјоделски науки и храна - Скопје**

Оценка (описно): _____

Датум на одбраната: _____

Група: Зоохигиена

Доктор на земјоделски науки

Во овој момент би сакал да се заблагодарам на многу луѓе кои дадоа свој придонес во остварувањето на оваа докторска дисертација. Во текот на работата многу фактори на различни начини влијаеја врз добиените резултати, повеќето од нив беа во интеракција, но недостатокот на кој било од нив можеше да ја спречи изработката на дисертација како оваа.

Со голема почит изразувам благодарност на мојот ментор, проф. д-р Методија Трајчев, раководител на катедрата за Здравје и благосостојба на животните на Институтот за анимална биотехнологија при ФЗНХ во Скопје, на кого особено сум му благодарен за моето научно усовршување и успешното пловење во научните води за да ја достигнам посакуваната цел – доктор на науки.

Корисните и концизни коментари и совети од страна на проф. д-р Жарко Маџиров гарантираа успех во изработката и пишувањето на дисертацијата.

Огромна благодарност изразувам до проф. д-р Милена Петровска, директор на Институтот за микробиологија и паразитологија на Медицинскиот факултет во Скопје, за стручните совети и плодната соработка која најискрено се надевам дека ќе продолжи и понатаму. Благодарност изразувам и до проф. д-р Гордана Јанкоска, Цаци и Маги, кои на располагање ми ги ставија сите методи и техники на работа за откривање на присутните микроорганизми во млекото, без кои оваа докторска дисертација ќе беше посиромашна во микробиолошките анализи.

Од сè срце би сакал да му се заблагодарам на проф. д-р Ицко Ѓорѓоски, декан на Природно-математичкиот факултет при Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје, за несебичната помош и дадениот одговор на прашањата кои се провлекуваа во текот на истражувањето до целосното оформување на докторската дисертација.

Голема благодарност за укажаната помош и корисните совети при изработката на дисертацијата изразувам кон проф. д-р Сретен Андонов, кој секогаш одвојуваше време несебично да ми помогне во средувањето на собраните податоци и статистичката обработка на истите, за сè да биде во најдобар ред.

Голема благодарност должам на проф. д-р Љупчо Јанкуловски кој несебично ми ги отвори вратите од Лабораторијата по генетика и со потполна доверба ми дозволи пристап до лабораториската опрема.

Од сè срце се заблагодарувам на сите кои беа вклучени во теренските и лабораториски анализи, и кои на кој било начин ми помогнаа во текот на истражувањето. Изразувам благодарност до сопственикот на ЗСК Струмица, с.

Сушица, м-р Горан Митров кој ми дозволи пристап на фармата за молзни крави, а стручната помош од страна на Зоки кој умешно ги реорганизираше човечките ресурси и активностите на фармата, ми го овозможи собирањето на примероците крв и млеко. Голема благодарност до доц. д-р Никола Хаџи-Петрушев кој ми помагаше при работата во биохемиската лабораторија на Институтот за биологија на Природно-математичкиот факултет во Скопје. Благодарност должам на доц. д-р Ленче Велкоска-Маркоска за укажаната помош при подготвувањето на хемиските супстанции неопходни за биохемиските анализи. Голема благодарност до колегите од ФЗНХ, со кои заедно пловиме во научните води. Благодарност за сите добронамерни совети.

Бескрајно сум благодарен на моите родители кои со начинот на воспитување и дадената можност за образование, од мене и мојата сестра направија успешни луѓе со визија за иднината. Голема благодарност до останатите роднини и пријатели кои се гордеат со мојата работа и ми дадоа неопходна поддршка за да успеам во реализација на поставената цел.

Најголемиот товар и пожртвуваност кога ќе се зафатите со научно-истражувачка работа го носи семејството. Голема благодарност на моите Валентина и Душан за целосното разбирање и поддршка што ми ја даваа во текот на изработката на оваа дисертација. Им благодарам што животот го делат со мене.

Со почит,

Димитар Наков

Посветено

на моите Душан и Валентина

ИСПИТУВАЊЕ НА ПОВРЗАНОСТА МЕЃУ ОКСИДАТИВНИОТ СТРЕС И МАСТИТОТ КАЈ МЛЕЧНИ КРАВИ ВО РАНА ЛАКТАЦИЈА

АПСТРАКТ

Во периодот на рана лактација во организмот на млечните крави настануваат важни метаболички промени кои може да доведат до појава на оксидативен стрес. Направени се двегодишни проспективни истражувања за утврдување на поврзаноста меѓу активноста на антиоксидативните ензими супероксид дисмутаза (SOD) и глутатион пероксидаза (GPx) во крвниот и млечниот серум на кравите и појавата на здравствени нарушувања на млечната жлезда и тоа: здрави КМТ(-) крави и заболени КМТ(+) крави (врз основа на позитивна или негативна реакција на калифорнија маститис тестот). КМТ(+) крави беа поделени на крави со нарушена секреција на млечната жлезда (НС) и крави со интрамамарна инфекција (ИМИ). Вкупно беа следени 211 млечни крави по сезони во годините на телење. Во текот на опсервираниот период по сезони на телење беа направени повторливи мерења на активноста на SOD и GPx во крвниот и млечниот серум на кравите во периодот 21. ден пред телење, периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата и периодот од 22. до 42. ден во лактацијата. Беше следена и дневната млечност на кравите во тест денот при првата, втората и третата контрола на млеко.

Вкупната преваленција на КМТ(+) крави изнесуваше 43,13%. Преваленцијата на НС и ИМИ изнесуваше 23,70% и 19,43%, соодветно. Кај 45,05% од КМТ(+) крави микробиолошки беше утврдено постоење на ИМИ. Вкупно беа утврдени 162 четвртинки на млечната жлезда со КМТ(+) реакција. Од нив, 56,17% беа микробиолошки негативни. Сензитивноста на калифорнија маститис тестот за откривање на интрамамарните инфекции изнесуваше 43,83%

Сезоните во годините на телење покажаа статистички значајно влијание ($p < 0,001$) на активноста на SOD и GPx во крвниот и млечниот серум на кравите. Здравствените нарушувања на млечната жлезда покажаа статистички значајно влијание на активноста на GPx во крвниот серум ($p < 0,001$) и GPx во млечниот серум ($p < 0,05$), додека не покажаа статистички значајно влијание на активноста на SOD во крвниот и млечниот серум на кравите. Периодите пред и по телење кога се земани примероците од крв и од млеко, покажаа статистички значајно влијание ($p < 0,001$) на активноста на SOD и GPx во крвниот серум, но не и на активноста на SOD и GPx во млечниот серум. Млечноста на кравите покажа статистички значајно влијание ($p < 0,05$) на активноста на GPx во млечниот серум. Одредувањето на активноста на GPx во крвниот и млечниот серум на кравите може да биде дијагностичка алатка за откривање на кравите со здравствени нарушувања на млечната жлезда во периодот на рана лактација.

Клучни зборови: млечни крави, мастит, оксидативен стрес, супероксид дисмутаза, глутатион пероксидаза

**ASSOCIATION BETWEEN OXIDATIVE STRESS AND MASTITIS OF DAIRY
COWS IN PERIOD OF EARLY LACTATION**

ABSTRACT

During the transition period important metabolic changes occur in dairy cows, which can also experience oxidative stress. The two years prospective study was carried out to assess the changes occurring in the activity of antioxidant enzymes superoxid dismutase (SOD) and glutathion peroxidase (GPX) between healthy CMT(-) cows and CMT(+) cows (on base of negative or positive reaction to California mastitis test). CMT(+) cows were subdivided in two groups: cows suffering from abnormal secretion of mammary gland (AS) and cows with intramammary infection (IMI). For this aim, there was observed totally 211 dairy cows, classified according seasons in years of calving and health status of mammary gland. Determination of the enzyme activity was performed on blood serum and milk whey with repeated measurements of activity made in three physiological periods: dry period 21 days before calving, period from beginning of lactation until 21st day in lactation, and period from 22nd to 42nd day in lactation. Also, there was followed monthly test day milk yield of observed cows at the 1th, the 2nd and the 3rd monthly test day.

The total prevalence of mammary health disorders (CMT(+) cows) was 43,13%. The prevalence of AS and IMI was 23,70% and 19,43%, respectively. The prevalence of IMI from CMT(+) cows was 45,05%. Based on California mastitis test (CMT), there was found totally 162 positive quarters of mammary gland. The sensitivity of CMT to intramammary infection was 43,82%.

The activity of SOD and GPx in blood and milk serum statistically significant ($p < 0.001$) differed between season years of calving. Health disorders of mammary gland showed statistically significant influence ($p < 0.001$) on GPx activity in blood serum and GPx activity in milk serum ($p < 0.05$), but there wasn't statistically significant influence on SOD activity in blood and milk serum. Physiological stages in transition period when blood and milk samples was taken, showed statistical significant influence ($p < 0.001$) on SOD and GPx activity in blood serum, but didn't show statistical significant influence on SOD and GPx activity in milk serum. The milk yield in test days had statistical significant influence on GPx activity in milk serum. The GPx activity in blood and milk serum can be used as predictive biomarker for determination of mammary gland health status in early lactation.

Key words: dairy cows, mastitis, oxidative stress, superoxid dismutase, glutathion peroxidase

СОДРЖИНА

ЛИСТА НА ТАБЕЛИ	10
ЛИСТА НА ГРАФИКОНИ	13
УПОТРЕБЕНИ СИМБОЛИ ВО ТЕКСТОТ	15
1. ВОВЕД	16
2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРА	20
2.1. ПАТОГЕНЕЗА НА ОКСИДАТИВНИОТ СТРЕС КАЈ ЖИВОТНИТЕ	20
2.2. АНТИОКСИДАТИВНИ МЕХАНИЗМИ КАЈ ЖИВОТНИТЕ	24
2.3. ЕПИДЕМИОЛОШКИ КАРАКТЕРИСТИКИ НА МАСТИТОТ КАЈ МЛЕЧНИТЕ КРАВИ.....	29
2.4. ПОВРЗАНОСТ НА ОКСИДАТИВНИОТ СТРЕС И ЗДРАВСТВЕНИТЕ НАРУШУВАЊА НА МЛЕЧНИТЕ КРАВИ.....	36
2.5. МОЖНОСТ ЗА ПРЕВЕНЦИЈА НА МАСТИТОТ ПРЕКУ КОНТРОЛА НА ОКСИДАТИВНИОТ СТРЕС КАЈ МЛЕЧНИТЕ КРАВИ.....	42
3. ЦЕЛИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО	48
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ	50
4.1. ОПИС НА ТЕХНОЛОГИЈАТА НА ЧУВАЊЕ И МОЛЗЕЊЕ НА ОПИТНИТЕ КРАВИ.....	50
4.2. ДИЗАЈН НА ИСТРАЖУВАЊАТА	51
4.3. МЕТОДОЛОГИЈА НА КОЛЕКТИРАЊЕ И ПОДГОТВУВАЊЕ НА БИОЛОШКИОТ МАТЕРИЈАЛ.....	54
4.4. ОДРЕДУВАЊЕ НА АКТИВНОСТА НА ЕНЗИМОТ СУПЕРОКСИД ДИСМУТАЗА (SOD).....	55
4.5. ОДРЕДУВАЊЕ НА АКТИВНОСТА НА ЕНЗИМОТ ГЛУТАТИОН ПЕРОКСИДАЗА (GPx)	59
4.6. ОДРЕДУВАЊЕ НА ВКУПНИТЕ ПРОТЕИНИ ВО КРВНИОТ И МЛЕЧНИОТ СЕРУМ.....	65
4.7. МЕТОДОЛОГИЈА НА КОЛЕКТИРАЊЕ, ПОДГОТВУВАЊЕ И МИКРОБИОЛОШКА АНАЛИЗА НА ПРОБИТЕ МЛЕКО	66
4.8. СТАТИСТИЧКА ОБРАБОТКА НА ПОДАТОЦИТЕ	69
5. РЕЗУЛТАТИ	72
5.1. ОПИС НА ИСПИТУВАНАТА ПОПУЛАЦИЈА МЛЕЧНИ КРАВИ.....	72
5.2. ПРЕВАЛЕНЦИЈА НА ЗДРАВСТВЕНИТЕ НАРУШУВАЊА НА МЛЕЧНАТА ЖЛЕЗДА.....	75

5.3. ПРОДУКТИВНИ КАРАКТЕРИСТИКИ НА ИСПИТУВАНАТА ПОПУЛАЦИЈА МЛЕЧНИ КРАВИ.....	93
5.4. КАЛИБРАЦИЈА НА РЕАКЦИИТЕ ЗА ОДРЕДУВАЊЕ НА АКТИВНОСТА НА ЕНЗИМИТЕ НА ОКСИДАТИВЕН СТРЕС.....	98
5.4.1. КАЛИБРАЦИЈА НА РЕАКЦИИТЕ ЗА ОДРЕДУВАЊЕ НА СУПЕРОКСИД ДИСМУТАЗАТА (SOD).....	98
5.4.2. КАЛИБРАЦИЈА НА РЕАКЦИИТЕ ЗА ОДРЕДУВАЊЕ НА.....	103
ГЛУТАТИОН ПЕРОКСИДАЗАТА (GPx).....	103
5.5. АКТИВНОСТ НА ЕНЗИМИТЕ НА ОКСИДАТИВЕН СТРЕС.....	106
5.5.1. АКТИВНОСТ НА ЕНЗИМИТЕ НА ОКСИДАТИВЕН СТРЕС ВО КРВНИОТ СЕРУМ.....	106
5.5.1.1. АКТИВНОСТ НА СУПЕРОКСИД ДИСМУТАЗАТА (SOD).....	106
5.5.1.2. АКТИВНОСТ НА ГЛУТАТИОН ПЕРОКСИДАЗАТА (GPx).....	113
5.5.2. АКТИВНОСТ НА ЕНЗИМИТЕ НА ОКСИДАТИВЕН СТРЕС ВО МЛЕЧНИОТ СЕРУМ.....	119
5.5.2.1. АКТИВНОСТ НА СУПЕРОКСИД ДИСМУТАЗАТА (SOD).....	119
5.5.2.2. АКТИВНОСТ НА ГЛУТАТИОН ПЕРОКСИДАЗАТА (GPx).....	126
5.6. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА ЗА УТВРДУВАЊЕ НА ПОВРЗАНОСТА ПОМЕЃУ МАСТИТОТ И ОКСИДАТИВНИОТ СТРЕС КАЈ МЛЕЧНИ КРАВИ.....	133
6. ДИСКУСИЈА.....	141
6.1. ЕВАЛУАЦИЈА НА КАЛИФОРНИЈА МАСТИТИС ТЕСТОТ.....	146
6.2. ПРЕВАЛЕНЦИЈА НА ПАТОГЕНИТЕ ПРИЧИНТЕЛИ НА МАСТИТ.....	150
6.3. КАЛИБРАЦИЈА НА РЕАКЦИИТЕ ЗА ОДРЕДУВАЊЕ НА АКТИВНОСТА НА АНТИОКСИДАТИВНИТЕ ЕНЗИМИ ВО КРВ И МЛЕКО.....	155
6.4. ПОВРЗАНОСТ ПОМЕЃУ ЗДРАВСТВЕНИТЕ НАРУШУВАЊА НА МЛЕЧНАТА ЖЛЕЗДА И ЕНЗИМСКИОТ АНТИОКСИДАТИВЕН СТАТУС.....	160
6.5. ВЛИЈАНИЕ НА ЛАКТАЦИЈАТА ВРЗ ЗДРАВСТВЕНИТЕ НАРУШУВАЊА НА МЛЕЧНАТА ЖЛЕЗДА И ВРЗ АКТИВНОСТА НА АНТИОКСИДАТИВНИТЕ ЕНЗИМИ.....	170
6.6. ВЛИЈАНИЕ НА СЕЗОНАТА ВРЗ ЗДРАВСТВЕНИТЕ НАРУШУВАЊА НА МЛЕЧНАТА ЖЛЕЗДА И ВРЗ АКТИВНОСТА НА АНТИОКСИДАТИВНИТЕ ЕНЗИМИ.....	179
7. ЗАКЛУЧОК.....	183
8. ЛИТЕРАТУРА.....	186

ЛИСТА НА ТАБЕЛИ

Табела 1. Протокол за изведување на тестот за одредување активност на SOD (μ l)...	57
Табела 2. Протокол за изведување на тестот за одредување активност на GPx (μ l)...	62
Табела 3. Структура на испитуваната популација млечни крави.....	72
Табела 4. Просечен термин на земање биолошки материјал по периоди, сезони на телење и години.....	73
Табела 5. Преваленција на здравствените нарушувања на млечната жлезда по сезона на телење и година.....	75
Табела 6. Преваленција на интрамамарните инфекции во однос на КМТ(+) крави по сезона на телење и година.....	77
Табела 7. Преваленција на здравствените нарушувања на млечната жлезда во првата година на истражување, зависно од периодот во лактација и сезоната на телење	79
Табела 8. Преваленција на здравствените нарушувања на млечната жлезда во втората година на истражување, зависно од периодот во лактација и сезоната на телење.....	80
Табела 9. Преваленција на здравствените нарушувања на млечната жлезда, зависно од периодот во лактација за целиот период на истражување.....	81
Табела 10. Преваленција на интрамамарните инфекции во однос на КМТ(+) крави, зависно од периодот во лактација по сезоната на телење и годината.....	82
Табела 11. Преваленција на здравствените нарушувања на четвртинките на млечната жлезда во првата година на истражување, зависно од периодот во лактација по сезони на телење.....	84
Табела 12. Преваленција на здравствените нарушувања на четвртинките на млечната жлезда во втората година на истражување, зависно од периодот во лактација по сезони на телење.....	85
Табела 13. Преваленција на здравствените нарушувања на четвртинките на млечната жлезда за двете години на истражување, зависно од периодот во лактација.....	86
Табела 14. Преваленција на интрамамарните инфекции во однос на четвртинките со КМТ(+) реакција, зависно од периодот во лактација по сезона на телење и година.....	87
Табела 15. Дистрибуција на изолираните патогени микроорганизми од четвртинките на млечната жлезда со КМТ(+) реакција.....	89
Табела 16. Дистрибуција на патогените причинители на мастит, зависно од сезоната на телење и годината на истражување.....	91
Табела 17. Антимикробна осетливост на изолираните бактериски причинители на мастит.....	92
Табела 18. Млечноста во првата година на истражување, зависно од здравствениот статус на млечната жлезда и сезоната на телење (kg).....	93
Табела 19. Млечноста на кравите во втората година на истражување, зависно од здравствениот статус на млечната жлезда и сезоната на телење (kg).....	94
Табела 20. Млечност на опитните крави за целиот двегодишен период на истражување, зависно од здравствениот статус на млечната жлезда (kg).....	95
Табела 21. Млечност на кравите, зависно од здравствениот статус на млечната жлезда и лактацијата по ред на кравите (kg).....	97
Табела 22. Контролна калибрациска реакција на SOD.....	98

Табела 23. Калибрација на реакцијата за одредување на SOD во крвниот серум на кравите.....	101
Табела 24. Калибрација на реакцијата за одредување на активноста на SOD во млечниот серум на кравите.....	102
Табела 25. Калибрација на реакцијата за одредување на активноста на GPx во крвниот серум.....	103
Табела 26. Калибрација на реакцијата за одредување на активноста на GPx во млечниот серум.....	104
Табела 27. Специфична активност на SOD во крвниот серум на кравите во првата година на истражување, зависно од сезоната на телење и периодот на земање на пробата (mU/mg протеини).....	107
Табела 28. Специфична активност на SOD во крвниот серум на кравите во втората година на истражување, зависно од сезоната на телење и периодот на земање на пробата (mU/mg протеини).....	109
Табела 29. Специфична активност на SOD во крвниот серум на кравите зависно од периодот на земање на пробата (mU/mg протеини).....	111
Табела 30. Специфична активност на GPx во крвниот серум на кравите во првата година на истражување, зависно од сезоната на телење и периодот на земање на пробата (mU/mg протеини).....	113
Табела 31. Специфична активност на GPx во крвниот серум на кравите во втората година на истражување, зависно од сезоната на телење и периодот на земање на пробата (mU/mg протеини).....	115
Табела 32. Специфична активност на GPx во крвниот серум на кравите зависно од периодот на земање на пробата (mU/mg протеини).....	117
Табела 33. Специфична активност на SOD во млечниот серум на кравите во првата година на истражување, зависно од сезоната на телење и периодот на земање на пробата (mU/mg протеини).....	119
Табела 34. Специфична активност на SOD во млечниот серум на кравите во втората година на истражување, зависно од сезоната на телење и периодот на земање на пробата (mU/mg протеини).....	122
Табела 35. Специфична активност на SOD во млечниот серум на кравите зависно од периодот на земање на пробата (mU/mg протеини).....	124
Табела 36. Специфична активност на GPx во млечниот серум на кравите во првата година на истражување, зависно од сезоната на телење и периодот на земање на пробата (mU/mg протеини).....	126
Табела 37. Специфична активност на GPx во млечниот серум на кравите во втората година на истражување, зависно од сезоната на телење и периодот на земање на пробата (mU/mg протеини).....	129
Табела 38. Специфична активност на GPx во млечниот серум на кравите зависно од периодот на земање на пробата (mU/mg протеини).....	131
Табела 39. Влијание на факторите на специфичната активност на SOD во крвниот серум на кравите.....	133
Табела 40. Тестирање на разликите на средните вредности на специфичната активност на SOD во крвен серум меѓу сезоните во годините на телење.....	133
Табела 41. Тестирање на разликите на средните вредности на специфичната активност на SOD во крвен серум меѓу периодите на земање примерок од крв.....	134
Табела 42. Влијание на факторите на специфичната активност на SOD во млечниот серум на кравите.....	135

Табела 43. Тестирање на разликите на средните вредности на специфичната активност на SOD во млечен серум меѓу сезоните во годините на телење.....	135
Табела 44. Влијание на факторите на специфичната активност на GPx во крвниот серум на кравите.....	136
Табела 45. Тестирање на разликите на средните вредности на специфичната активност на GPx во крвниот серум на кравите меѓу сезоните во годините на телење	136
Табела 46. Тестирање на разликите на средните вредности на специфичната активност на GPx во крвниот серум на кравите зависно од здравствениот статус на млечната жлезда.....	137
Табела 47. Тестирање на разликите на средните вредности на специфичната активност на GPx во крвен серум меѓу периодите на земање примерок од крв.....	137
Табела 48. Влијание на факторите на специфичната активност на GPx во млечниот серум на кравите.....	138
Табела 49. Тестирање на разликите на средните вредности на специфичната активност на GPx во млечниот серум на кравите меѓу сезоните во годините на телење.....	138
Табела 50. Тестирање на разликите на средните вредности на специфичната активност на GPx во млечен серум меѓу групите крави со различен здравствен статус на млечната жлезда	139
Табела 51. Пирсонов коефициент на корелација за специфичната активност на SOD и GPx во крвниот и млечниот серум на кравите	140

ЛИСТА НА ГРАФИКОНИ

<i>Графикон 1.</i> Графички приказ на структурата на испитуваната популација крави...73	73
<i>Графикон 2.</i> Просечен термин на земање биолошки материјал по периоди, сезони на телење и година.....74	74
<i>Графикон 3.</i> Дистрибуција на испитуваната популација крави во однос на здравствениот статус на млечната жлезда по сезона на телење и година.....76	76
<i>Графикон 4.</i> Преваленција на здравствените нарушувања на млечната жлезда по сезона на телење и година.....77	77
<i>Графикон 5.</i> Преваленција на нарушената секреција на млечната жлезда во однос на вкупниот број на испитувани крави, зависно од бројот на лактацијата, сезоната на телење и годината.....78	78
<i>Графикон 6.</i> Преваленција на интрамамарните инфекции во однос на вкупниот број на испитувани крави, зависно од бројот на лактацијата, сезоната на телење и годината.....79	79
<i>Графикон 7.</i> Преваленција на здравствените нарушувања на млечната жлезда, зависно од периодот во лактација, сезоната на телење и годината.....82	82
<i>Графикон 8.</i> Преваленција на здравствените нарушувања на четвртинките на млечната жлезда во испитуваната популација опитни крави, зависно од периодот во лактација, сезоната на телење и годината.....87	87
<i>Графикон 9.</i> Преваленција на нарушената секреција на четвртинките на млечната жлезда, зависно од бројот на лактацијата, сезоната на телење и годината.....88	88
<i>Графикон 10.</i> Преваленција на инфекциите на четвртинките на млечната жлезда, зависно од бројот на лактацијата, сезоната на телење и годината.....89	89
<i>Графикон 11.</i> Дистрибуција на изолираните патогени микроорганизми од четвртинките на млечната жлезда со КМТ(+) реакција.....90	90
<i>Графикон 12.</i> Графички приказ за млечноста на опитните крави зависно од здравствениот статус на млечната жлезда, сезоната на телење и годината.....96	96
<i>Графикон 13.</i> Линераност на контролната калибрациска реакција за одредување на активноста на SOD ($\mu\text{U/ml}$).....99	99
<i>Графикон 14.</i> Промена на апсорбанцата во единица време на стандардот, крвниот и млечниот серум во зависност од активноста на SOD.....99	99
<i>Графикон 15.</i> Логаритамска функција за пресметување на активноста на SOD во крвниот и млечниот серум.....100	100
<i>Графикон 16.</i> Калибрациски криви за одредување на активноста на SOD во крвниот серум.....101	101
<i>Графикон 17.</i> Калибрациски криви за одредување на активноста на SOD во млечниот серум.....102	102
<i>Графикон 18.</i> Калибрациски криви за одредување на активноста на GPx во крвниот серум.....103	103
<i>Графикон 19.</i> Калибрациски криви за одредување на активноста на GPx во млечниот серум.....105	105
<i>Графикон 20.</i> Специфична активност на SOD во крвниот серум во првата година на истражување, зависно од периодот на земање на пробата и сезоната на телење.....108	108

Графикон 21. Специфична активност на SOD во крвниот серум во втората година на истражување, зависно од сезоната на телење и периодот на земање на пробата.....	111
Графикон 22. Специфична активност на SOD во крвниот серум за целиот период на истражување, зависно од периодот на земање на пробата.....	112
Графикон 23. Специфична активност на GPx во крвниот серум во првата година на истражување, зависно од периодот на земање на пробата и сезоната на телење.....	114
Графикон 24. Специфична активност на GPx во крвниот серум во втората година на истражување, зависно од сезоната на телење и периодот на земање на пробата.....	116
Графикон 25. Специфична активност на GPx во крвниот серум за целиот период на истражување, зависно од периодот на земање на пробата.....	118
Графикон 26. Специфична активност на SOD во млечниот серум во првата година на истражување, зависно од сезоната на телење и периодот на земање на пробата.....	121
Графикон 27. Специфична активност на SOD во млечниот серум во втората година на истражување, зависно од сезоната на телење и периодот на земање на пробата.....	124
Графикон 28. Специфична активност на SOD во млечниот серум за целиот период на истражување, зависно од периодот на земање на пробата.....	125
Графикон 29. Специфична активност на GPx во млечниот серум во првата година на истражување, зависно од сезоната на телење и периодот на земање на пробата.....	128
Графикон 30. Специфична активност на GPx во млечниот серум во втората година на истражување, зависно од сезоната на телење и периодот на земање на пробата.....	130
Графикон 31. Специфична активност на GPx во млечниот серум за целиот период на истражување, зависно од периодот на земање на пробата.....	132

УПОТРЕБЕНИ СИМБОЛИ ВО ТЕКСТОТ

SOD	Супероксид дисмутаза
GPx	Глутатион пероксидаза
POM	Реактивни оксидативни метаболити
TRIS	Тризма база
HCl	Хлороводородна киселина
DTPA	Диетилен триамин пентаоцетна киселина
KH ₂ PO ₄	Калиум дихидроген фосфат
EDTA	Етилен диамин пентаоцетна киселина
GSH	Редуциран глутатион
GSSG	Оксидиран глутатион
NADPH	Редуциран β-никотинамид-аденин-динуклеотид фосфат
NADP ⁺	Оксидиран β-никотинамид-аденин-динуклеотид фосфат
GR	Глутатион редуктаза
cH ₂ O ₂	Cumene Hydroperoxid
I	Инхибиција на автооксидацијата на пирогалолот
ΔA ₄₁₅	Промена на апсорбанцата во минута, читана на бранова должина од 415 nm
ΔA ₃₄₀	Промена на апсорбанцата во минута, читана на бранова должина од 340 nm
KMT	Калифорнија маститис тест
KMT(-) крави	Крави кои покажале негативна реакција на калифорнија маститис тестот
KMT(+) крави	Крави кои покажале позитивна реакција на калифорнија маститис тестот
HC	Нарушена секреција на млечната жлезда
ИМИ	Интрамамарна инфекција
($\bar{x} \pm S \bar{x}$)	Средна вредност ± стандардна грешка на аритметичката средна вредност
L	Лактација по ред на кравите
YS_C	Сезона во годината на телење: 112 (1 март до 31 мај 2012 г.); 212 (1 јуни до 31 август 2012 г.); 312 (1 септември до 30 ноември 2012 г.); 412 (1 декември 2012 г. до 28 февруари 2013 г.); 2012 (година на телење, независно од сезоната); 113 (1 март до 31 мај 2013 г.); 213 (1 јуни до 31 август 2013 г.); 313 (1 септември до 30 ноември 2013 г.); 413 (1 декември 2013 до 28 февруари 2014 г.); 2013 (година на телење, независно од сезоната).
T	Период кога се земани примероците од биолошкиот материјал: -21 (периодот 21 ден пред телење); 21 (периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација); 42 (периодот од 22. до 42. ден во лактација).
C_П	Сезона во годината на телење по период кога се земани примероците од биолошкиот материјал: 112_-21; 112_21; 112_42; 212_-21; 212_21; 212_42; 312_-21; 312_21; 312_42; 412_-21; 412_21; 412_42; 113_-21; 113_21; 113_42; 213_-21; 213_21; 213_42; 313_-21; 313_21; 313_42; 413_-21; 413_21; 412_43.
M	Здравствен статус на млечната жлезда
ТДМ_1	Просечна дневна млечност на кравите во тест денот при првата контрола на млеко
ТДМ_2	Просечна дневна млечност на кравите во тест денот при втората контрола на млеко
ТДМ_3	Просечна дневна млечност на кравите во тест денот при третата контрола на млеко

1. ВОВЕД

Во последните 25 години, модернизацијата на фармите за млечни крави и иновациите во млечната индустрија создадоа нови предизвици за фармерите и млекопреработувачите. За да се совладаат овие предизвици, а истовремено и да се биде конкурентен на пазарот за млеко, денес, производството на кравјо млеко е насочено кон зголемување на продукцијата на млеко преку зголемување на бројот на високо продуктивни грла во стадата, чиј број има тенденција на намалување. Зголемувањето на продукцијата на млеко се постигнува со интензивна селекција во говедарството за зголемена млекопродукција, подобрување на здравствениот менаџмент на фармите и факторите од околината. Сепак, генерално е прифатено дека едностраната селекција има негативно влијание врз отпорноста на животните на разни здравствени нарушувања (Вегу и сор., 2005). Од факторите на околината големо влијание на продукцијата на млеко имаат условите за сместување, исхраната, како и примената на новите технологии во современото говедарство. Порано, во периодот по телење на млечните крави и почетокот на лактацијата, најголемо внимание било посветувано на превенирањето на инфективните заболувања и зголемувањето на енергетската исхрана. Денес, тој период е малку покомплексен, па превенцијата на здравствените нарушувања во краварството е насочено кон успешното менаџирање на стресот, контролата на енергетскиот баланс и експозицијата на животните на ендотоксини и оксидативен стрес. Сложената интеракција на овие инсулти, во соодејство на факторите на околината, има негативно влијание врз одбранбената реакција, исхраната, метаболичките и воопшто имунолошкиот систем на организмот. Успешното менаџирање во одгледувањето на млечни крави, кое подразбира подобрување на продуктивните и репродуктивните перформанси, особено во периодот на доцниот гравидитет и раната лактација, придонесува за намалување на економските загуби на фармите.

Периодот пред телење и почетокот на лактацијата е критичен за здравствениот статус на млечните крави, од причина што некои од кравите често влегуваат во фаза на негативен енергетски баланс. Имено, во тој период, заради зголемените енергетски потреби во организмот на високомлечните крави настануваат значајни физиолошки и ендокринолошки промени. Тие промени се во насока на мобилизација на енергетските резерви, пред сè масното ткиво, заради

фактот што во овој период нивото на гликозата во крвта на високомлечните крави многу брзо се намалува. Хипогликемијата во овој период е последица на намалениот внес на сува материја преку храната. Зголемената мобилизација на мастите е во форма на незаситени масни киселини. Нивната нецелосна оксидација доведува до акумулирање на оксидативни продукти, а што претставува предуслов за навлегување на организмот во состојба на оксидативен стрес (LeBlanc, 2008). Во овој период, во организмот на високомлечните крави се одвиваат поинтензивни метаболички процеси, кои пак ги зголемуваат потребите за кислород, што последично резултира со создавање на реактивни оксидативни метаболити и појава на оксидативен стрес. Сите овие случувања го зголемуваат ризикот за појава на некои метаболички и други здравствени нарушувања, како што се: млечната треска, кетозата, задржувањето на постелката, дислокацијата на абомасусот, метритисот и маститот (Drackley, 1999; Bernabucci и соp., 2002; Bernabucci и соp., 2005; Castillo и соp., 2005; Sordillo, 2005; Goff, 2006; Wilde, 2006; Sordillo и Aitken, 2009). Според Goff и Horst (1997) „Преодот од стелност и нелактациска фаза кон нестелност и лактациска фаза за организмот на кравите претставува лошо искуство кое ја нарушува нивната благосостојба, па кога би можеле да го бираат периодот кога сакаат да живеат и да бидат продуктивни, тогаш сигурно не би го избрале тој период“. Затоа, доколку фармерите и експертите успешно ги менаџираат ризичните фактори во овој преоден период, тогаш профитабилноста на стадото би била сигурна.

Оксидативниот стрес се дефинира како нарушена рамнотежа меѓу продукцијата на реактивните кислородни радикали и антиоксидативниот капацитет на клеточно или индивидуално ниво (Halliwell, 2006; Valko и соp., 2007). Интеракцијата на прооксидантите и антиоксидантите во живите организми го детерминира биолошкиот редокс-статус кој се нарушува при состојбите на оксидативен стрес (Jones, 2006).

Поврзаноста на физиолошките промени со губењето на антиоксидативниот потенцијал на организмот во периодот непосредно пред телењето и по телење, било потврдено од повеќе автори (Stefanon и соp., 2005; Sordillo и соp., 2007). Научно е докажано дека нарушувањето на редокс-рамнотежата, односно појавата на оксидативен стрес во организмот има негативно влијание врз здравјето и функционалноста на организмот (Wilde, 2006; Sordilo и соp., 2007). Така, некои заболувања настануваат како директна последица на оксидативниот стрес, или пак

оксидативниот стрес претставува секундарна појава што се јавува како последица на одредени заболувања. Ова може да доведе до дополнителни оштетувања на ткивата во организмот.

Слободните оксидативни радикали се високо реактивни супстанции кои континуирано се произведуваат во текот на метаболичките процеси, коишто во ниски концентрации имаат позитивен ефект врз организмот преку активирање на биолошките патишта, земајќи учество во нормалното функционирање на метаболичките процеси. Слободните оксидативни радикали главно учествуваат во физиолошките процеси во организмот, како што се: имунолошкиот одговор, пред сè фагоцитозата на микроорганизмите, метаболизмот на незаситените масни киселини, воспалителните реакции и детоксикацијата. Освен тоа, оксидативниот стрес е неопходен за започнување на процесите на регенерација и репарација на ткивата.

Присуството на слободните оксидативни радикали во организмот во високи концентрации има штетно, односно токсично дејство. Сепак, за среќа, аеробните организми, во кои спаѓаат и високомлечните крави, поседуваат антиоксидативни механизми кои го ограничуваат нивното штетно дејство и овозможуваат одржување на хомеостазата на организмот. Овие антиоксидативни механизми се засновани врз активноста на некои ензими и други есенцијални супстанции присутни во организмот. Нивното активирање претставува основа за адаптацијата на организмот на факторите на околината. Така на пример, според Nagmon и sor. (1997) топлотниот стрес настанат како резултат на топлотната интолеранција на кравите во лактација, го намалува антиоксидативниот капацитет на плазмата што е причина за појава на оксидативен стрес.

Улогата на антиоксидативните механизми во превенцијата на многу болести, била честа тема на проучување во хуманата и ветеринарната медицина (Miller и sor., 1993; Valko и sor., 2007). Постојат повеќе истражувања кои ја проучуваат проблематиката на врската меѓу оксидативниот стрес и појавата на мастит кај високомлечните крави. Утврдено е дека оксидативниот стрес и имунолошката супресивност во периодот по телење го зголемуваат ризикот за појава на мастит, едем на млечната жлезда, метритис, заостанување на постелката и паразитемија (Erskine и sor, 1987; Parantainen и sor., 1987; Kankofer, 2002). Од друга страна, појавата на мастит може да индуцира зголемено формирање оксидативни радикали во млекото, што води во состојба на оксидативен стрес, особено изразено во

периодот на рана лактација (Sordillo и сop., 2007). Важно е да се нагласи дека и двете форми на мастит, супклиничкиот и клиничкиот, се поврзани со создавањето на слободни радикали во млекото, зголемувањето на вкупниот оксидативен капацитет и намалувањето на вкупниот антиоксидативен капацитет на млекото (Atakisi и сop., 2010). Ова, на некој начин, претставува еден вид „затворен круг“ меѓу оксидативниот стрес и маститот. И други автори го потенцираат влијанието на формирањето на реактивни оксидативни радикали во етиологијата на маститот кај млечните крави (Bouchard и сop., 1999; Blum и сop., 2000; Komine и сop., 2004). Според нив, реактивните оксидативни радикали се одговорни за оштетувањето на секреторните клетки на млечната жлезда. Во прилог на влијанието на оксидативниот стрес врз појавата на мастит кај кравите одат и истражувањата на Allison и Laven (2000), според кои постои значајна поврзаност помеѓу додавањето на антиоксиданси во храната, најчесто витамин Е и селен, и намалената инциденција на мастит.

Во млекото добиено од крави со мастит се присутни фактори кои посредуваат во настанувањето на воспалителниот процес, но и патогени бактерии со нивните токсини (ентеротоксини, ендотоксини). Истовремено, се зголемува концентрацијата на антиоксидативните ензими, липазата, протеазата, оксидазата, плазминот и плазминогенот. Ова има големо влијание врз стабилноста и вкусот на млекото, како и на неговото понатамошно процесирање (Nielsen и сop., 2001).

2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРА

2.1. ПАТОГЕНЕЗА НА ОКСИДАТИВНИОТ СТРЕС КАЈ ЖИВОТНИТЕ

Оксидо-редукциските процеси или како што уште се нарекуваат редокс-процесите, се едни од најважните хемиски процеси во живиот организам. Тоа се процеси во кои се врши размена на електрони, односно нивно оддавање (оксидација) или примање (редукција). Редукцијата настанува при дејството на соединение кое се нарекува редуктор, кое при тоа се оксидира, а соединението кое доведува до оксидација се нарекува оксиданс, кое при тоа се редуцира. Оксидансите се многу нестабилни, реактивни соединенија. Тие поседуваат неспарен електрон и имаат способност да ги оксидираат блиските стабилни молекули за да „украдат“ електрон кој им е потребен за да станат стабилно соединение. Ова може да се случи со еден од трите механизми: со апстракција (истиснување) на водородниот атом, со истиснување електрони или со додавање кислород.

Слободните радикали претставуваат атоми или молекули кои поседуваат слободни парови на електрони. На тој начин можат да истиснуваат електрони од други соединенија, и при тоа ги оксидираат и претвораат во нови слободни радикали. Слободните радикали се многу нестабилни хемиски соединенија што ги прави многу агресивни и со краток „животен век“. Прв пат поимот „реактивни оксидативни молекули или метаболити“ бил употребен од страна на Powell (1991). Така биле наречени слободните кислородни радикали и пероксидните оксиданси.

Постојат неколку класификации за поделба на оксидансите. Во зависност од нивните хемиски својства или реактивност, оксидансите се поделени во неколку групи. Според една широко прифатена класификација, оксидансите се поделени зависно од тоа дали се или не се слободни радикали, односно дали во надворешната орбита тие содржат слободен електрон што ги прави нестабилни (Kohen и Nyska, 2002). Според оваа класификација слободни радикали се: хидроксилниот радикал (OH \cdot), азотниот оксид (NO \cdot) и супероксидниот анјон (O $_2\cdot^-$). Како хемиски соединенија кои може да бидат многу реактивни, без притоа да бидат слободни радикали, се: пероксинитритите (ONOO \cdot), водородниот пероксид (H $_2$ O $_2$) и хипохлорестата киселина (HClO).

Според друга класификација (Buettner, 1993), која се води од биолошкиот аспект, односно од оштетувањата на клетките кои ги предизвикуваат радикалите, најреактивен радикал е хидроксилниот анјон (OH^-), кој има краток животен век. Тој може да доведе до големо оштетување на местото каде што е создаден, од причина што не може да дифундира подалеку од местото на создавање.

Друга група автори (Morrisey и O'Brien, 1998), слободните радикали ги класифицирале во неколку групи, според реактивната група во нивната молекула. Најзастапени во живите организми се кислородните слободни радикали. Во нивната молекула кислородот претставува функционален центар.

Другата група слободни радикали ја сочинуваат тиолните радикали. Нивната реактивна група содржи сулфур. Според оваа класификација, соединенијата од третата група радикали во своите реактивни групи содржат јаглерод, фосфор или азот.

Како биолошки важни слободни радикали уште се споменуваат и трихлорметилот (CCl_4), пероксилните (RO_2) и алкоксилните радикали (RO).

Хидроксилниот радикал (OH^-) главно се наоѓа во цитосолот на клетките, додека радикалите формирани при оксидација на масните киселини се наоѓаат во клеточната мембрана. Супероксидните и хидроксилните радикали се наоѓаат во двете клеточни компоненти.

Во организмот на животните, оксидативните продукти се создаваат во аеробните процеси, како што се: стресот, воспалителните реакции, ткивните повреди, инфекциите или детоксикацијата на многу продукти (Nockels, 1991). При појавата на инфекции или автоимун одговор, имунолошките реакции придонесуваат за дополнително насобирање на оксидансите. Во текот на аеробниот клеточен метаболизам се создаваат неколку силни оксиданси, како што се: слободните радикали, супероксидите, пероксидните радикали, хидроксилните радикали и други оксиданси кои не се радикали, водороден пероксид и слободен кислород.

Потеклото на реактивните оксидативни радикали во живиот организам може да биде ендогено и/или егзогено.

Ендогените слободни радикали се создаваат во клетките, а делуваат или во клетката или надвор од неа. Тие во организмот се создаваат случајно или континуирано, на четири начини. Првиот начин на создавање се врши при трансферот на електрони во процесот на оксидативната фосфорилација во

митохондриите (Gutteridge и Halliwell, 1994). Во тие процеси, одредено количество кислородни молекули го напуштаат синцирот за транспорт на електрони при што се формираат интермедијални реактивни оксидативни радикали, како што се: супероксидните радикали, водородниот пероксид и хидроксилните јони. Levine и Kidd (1985) успеале дури и да пресметат дека 2-5% од електроните може да го напуштат синцирот за нивен транспорт, предизвикувајќи делумна редукција на кислородот во форма на супероксиден јон.

Вториот начин на создавање на слободни радикали настанува во пероксизомите кои содржат Асу1 СоА-оксидаза, допамин, β -хидроксилаза, урат-оксидаза и други. Тие генерираат водородни пероксиди како интермедијални продукти.

Третиот начин го опфаќа ензимскиот цитохромен систем кој претставува примарен одбранбен систем против неколку ксенобиотски и ендогени супстанции при што учествува во зголемување на концентрацијата на слободни радикали во организмот.

Четвртиот начин на создавање супероксидни ањјони во организмот е поврзан со фагоцитозата. Имено, тогаш фагоцитните клетки, моноцитите, неутрофилите и макрофагите, испуштаат оксидативни радикали, и тоа не само супероксидни ањјони, туку и водороден пероксид, хипохлорити и азотни оксиди, со чие дејство се уништуваат патогените микроорганизми. Така на пример, реакцијата катализирана од супероксид дисмутаза (SOD), во внатрешната мембрана на митохондриите, доведува до синтеза на кислород и водороден пероксид (Agarwal и Prabhakaran, 2005). Во оваа реакција се отстрануваат супероксидите од васкуларниот ѕид, но истовремено и генерира создавање на водороден пероксид, кој има многу важна регулаторна улога. Заради ова, активноста на супероксид дисмутаза може да биде многу важна во регулирањето на клеточната функција и клеточната одбрана од повреди и исхемија. Ензимите каталаза и глутатион пероксидаза го редуцираат водородниот пероксид до вода и кислород (Halliwell, 1987).

Егзогените извори на реактивни оксидативни радикали, директно или индиректно, учествуваат во вкупното ниво на оксидативни радикали во организмот (Miller и соp., 1993). Како надворешни извори на оксидативни радикали се јавуваат јонизирачкото и нејонизирачкото зрачење, загадувањето на воздухот со токсични гасови, хемикалиите и токсините (Bandyopadhyay и соp., 1999). Некои патогени

микроорганизми доведуваат до создавање секундарни оксиданси кога го активираат имунолошкиот систем на домаќинот. Други микроорганизми пак, можат да доведат до директна оксидација. При исхрана на животните со храна која не содржи доволно количество хранливи материи, заради намалената способност на клеточниот одбранбен механизам, настанува индиректен оксидативен стрес. Понатаму, утврдено е дека при исхрана на животните со храна која содржи повеќе железо и бакар, доаѓа до побрзо создавање на слободни радикали од пероксидите (Morrisey и O'Brien, 1998). Способноста на овие метални јони да примаат и испуштаат електрони претставува основа за настанување на некои токсични реакции во организмот (Halliwell и Chirico, 1993).

Кога слободните радикали во организмот се создаваат во поголеми количества, при што антиоксидативните механизми не можат да ги неутрализираат, започнува низа биохемиски реакции со учество на O_2^- во Фентоновата реакција. Оваа реакција се карактеризира со редукција на тровалентното железо (Fe^{3+}) и продукција на екстремно реактивни хидроксилни радикали. Понатаму, овие радикали предизвикуваат модификација на важните физиолошки и метаболички функции на клетките. Зголеменото присуство на оксидативните радикали во клетките предизвикува пероксидативно оштетување на нивните макромолекули и мембрани. Ова доведува до апоптоза и некроза на клетките предизвикувајќи нивна смрт, а како резултат на тоа настануваат структурни оштетувања на ткивата (Bandyopadhyay и сор., 1999). Освен тоа, хидроксилните радикали иницираат пероксидативна реакција во која се создаваат пероксидативни соединенија кои имаат канцерогено, тератогено, токсично и воспалително дејство на местото на нивното создавање, но и во целиот жив организам (Swarup, 2001).

Според истражувањата на некои автори направени на различни животински видови и експериментални животни, оксидативниот стрес е во корелација со етиопатогенезата на бројни процеси, како што се: стареењето, клеточната апоптоза и анемијата (Halliwell и Gutteridge, 2003). Интензивното акумулирање на реактивните оксидативни метаболити (РОМ) претставува важен ризик-фактор за зголемување на инциденцијата на здравствените нарушувања кај млечните крави. Зголемените концентрации на РОМ доведуваат до мутации, хромозомски аберации, карциногенеза и клеточна смрт (Cerutti, 1985). Постојат повеќе научни докази за нарушувањето на редокс-статусот на млечните крави кај различни заболувања, како

што се на пример леукозата, паразитарните заболувања, бруцелозата, пневмонијата, маститот, млечната треска, ендометритот, задржувањето на постелката и репродуктивните нарушувања (Kankofer, 2002; Erisir и сор., 2006; Lykkesfeldt и Svendsen, 2007; Sordillo, 2013). Во прилог на ова одат и сознанијата на други автори, дека во многу случаи на здравствени нарушувања кај животните, како што се на пример: идиопатската миокардиопатија и артритисот кај кучињата, нутритивната енцефалопатија кај бројлерите, диететната хепатоза кај свињите, стеатозата и нутритивната миодистрофија кај коњите, сепсата кај свињите, по третманот со антиоксиданси нарушувањата добивале поповолен тек (Gaal и сор., 1996; Basu и Eriksson, 2001). Понатаму, патогенезата на болеста на моторните неврони се поврзува со оксидативните нарушувања кои настануваат како резултат на недостатокот на витаминот Е и зголемената концентрација на бакар во нервното ткиво (Polack и сор., 2000). Во литературата се споменуваат и други патолошки состојби кои се поврзани со антиоксидативниот дисбаланс и недостатокот на селен во организмот. Такви се на пример болеста на белите мускули, слабоста на новородените животни, имунолошката инсуфициенција, неплодноста, абортусот, појавата на цисти на јајниците, метритот, дегенерацијата на тестисите и заостанувањето во развојот на животните (Wichtel, 1998).

Мора да се напомене дека РОМ не се секогаш поврзани со оксидативните оштетувања. Во мали концентрации тие претставуваат внатрешни сигнални молекули кои се вклучуваат во контролата на некои степенести физиолошки механизми, како што се: клеточната диференцијација, пролиферацијата, апоптозата, воспаленијата. Покрај тоа, РОМ имаат улога и во регулацијата на редокс-осетливите сигнални метаболички патишта (Lo и сор., 1996).

2.2. АНТИОКСИДАТИВНИ МЕХАНИЗМИ КАЈ ЖИВОТНИТЕ

Во текот на филогенезата биле развиени неколку одбранбени механизми за одржување на нормалната хомеостаза во организмите, како што се: фагоцитозата, хемостазата, регенерацијата, репарацијата, антиоксидативната одбрана, адаптацијата на амбиенталната температура, специфичниот имунолошки одговор и други. Сите овие механизми имаат свои специфики за време на онтогенезата кај секоја

индивидуа. Несоодветниот капацитет на одбранбените механизми претставува предиспонирачки фактор за заболување на организмот од многу болести.

Најчесто проучуван одбранбен механизам кај животните претставува утврдувањето на антиоксидативниот капацитет на ткивата во одредени физиолошки и патолошки состојби на нивниот организам (Gritz и Rahko, 1990). Поради постојаната изложеност на оксидативните соединенија, аеробните живи организми се адаптираат и постојано се борат против оксидативниот стрес со помош на сложен антиоксидативен одбранбен систем. Овој систем го ограничува штетното дејство на реактивните оксидативни метаболити (Sharma и соp., 2005). Антиоксидансите се дефинираат како супстанции кои го превенираат или санираат оксидативното оштетување на молекулите (Halliwell и Gutteridge, 2007). Дури и во ниски концентрации антиоксидансите го одложуваат или превенираат оксидирањето на одредени молекули. Кога реактивните оксидативни метаболити ќе го надминат антиоксидативниот капацитет на организмот, настанува состојба на оксидативен стрес.

Клеточните антиоксидативни одбранбени механизми се одвиваат во три фази, и тоа: отстранување на оксидативните продукти, инкапсулирање на оксидативните оштетувања и нивно обновување.

Антиоксидативните системи кои се наоѓаат во клетките или во останатите биолошки течности ги штитат биолошки важните макромолекули од нивното пероксидативно оштетување. Нивната протективна улога резултира со подобрување на имунолошкиот одговор со што се намалува инциденцијата на инфективните заболувања, вклучително и на маститот. Природните антиоксидативни механизми се класифицираат врз основа на нивната растворливост во масти или вода, или пак нивните хемиски и физички карактеристики (ензимски или не-ензимски). Ензимскиот антиоксидативен систем се базира врз активноста на супероксид дисмутазата, глутатион пероксидазата и каталазата (Halliwell, 1987). Групата на неензимски антиоксиданси примарно се застапени во плазмата, и ја сочинуваат сулфхидрилните групи, глутатионот, аскорбатите, уратите, витаминот Е и β -каротинот (Urban и соp., 2006).

Антиоксидативната реакција започнува со конвертирање на реактивните оксидативни молекули на O_2^- и H_2O_2 во форма која не реагира со јонот на железото (Fe^{2+}), кој ја катализира нивната редукција со дисмутација, во посредство на

ензимите супероксид дисмутазата и глутатион пероксидазата (Gutteridge и Halliwell, 1994). Потоа, во второто ниво на заштита, железото се оксидира во послабо реактивна форма со посредство на церулоплазминот. Тогаш се формираат комплекси со трансферинот и лактоферинот кои имаат за цел превенирање на потенцијалната реакција со O_2^- и H_2O_2 и продукцијата на OH^- . Третото ниво ја опфаќа заштитата на целните молекули од реактивниот железен јон (Fe^{2+}) преку супституција со јонот на цинк (Zn^{2+}) кој има слична електронска градба, но не учествува во трансферот на електрони. Четвртото ниво на заштита ги вклучува комплексните молекули кои ја прекинуваат верижната реакција на оксидација. Тоа се, на пример, протеините, пред сè албумините, липосолубилните соединенија, како што се α -токоферол, β -каротините, ретиноичната киселина и хидросолубилните аскорбати, феноли и урати, коишто претставуваат половина од вкупниот антиоксидативен капацитет на плазмата и имаат способност да ги неутрализираат пероксидните радикали (Wagner и соp., 1987). Петтото ниво на антиоксидативна заштита се должи на активноста на алдехид дехидрогеназата, што ги неутрализира цитотоксичните алдехиди кои настануваат при пероксидативното разложување на мастите.

Меѓу најефикасните антиоксиданси се ензимите кои директно ја катализираат редукцијата на реактивните оксидативни молекули. Така, дисмутацијата на супероксидните анјони во H_2O_2 и O_2 настанува под дејство на супероксид дисмутазата (SOD). Потоа H_2O_2 , под дејство на каталазата и глутатион пероксидазата, се конвертира до H_2O и O_2 (Halliwell, 1987). Овие ензими ефикасно ги контролираат оксидативните радикали во цитосолот на клетката.

Постојат три главни форми на SOD. Овие форми се делат зависно од металниот јон кој го содржат во себе и кој учествува во пренесувањето на електроните. Така, SOD која содржи манган е присутна во митохондриите (Mn-SOD), SOD која содржи бакар и цинк CuZn-SOD, и е присутна во цитоплазмата, додека SOD која се лачи од клетките во екстраклеточната течност и може да содржи железо, но и бакар и цинк се означува како Ec-SOD (Fridovich, 1986). Некои истражувања ја потенцираат улогата на овој ензим во превенирањето на воспалителните процеси и заштитата од некои канцерогени болести во чија патогенеза важна улога имаат супероксидните анјони (Jakubowski и соp., 2000). Во хуманото млеко, покрај Cu/Zn-SOD, во истражувањата направени од Kiyosawa и соp. (1993), била детектирана активност и на Mn-SOD. Во кравјото млеко е утврдено

присуството на Cu/Zn-SOD. Таа има иста специфична активност, молекуларна тежина и електрофоретски особини како и Cu/Zn-SOD изолирана од еритроцитите на говедата (Koguska-Dahl и сop., 1979).

Глутатионот е најважен клеточен тиол кој учествува како супстрат на неколку трансферази, пероксидази и други ензими кои ги спречуваат или намалуваат штетните ефекти на слободните кислородни радикали. Редокс-циклусот на глутатионот е централен механизам за неутрализација на алкил хидроксидите и метаболизирање на H₂O₂. Постојат две различни класи на глутатион пероксидаза (GPx): селено зависни GPx (EC 1.11.1.9) и селено независни GPx (EC 2.5.1.18). И двата ензима го користат глутатионот за редуцирање на органските пероксиди. Од аспект на здравствената состојба на млечните крави и нивната благосостојба, најпроучувани се селено зависните GPx. Првиот литературен податок за активноста на GPx бил даден од Mills (1957), кој демонстрирал катаболизам на H₂O₂ во присуство на глутатион во лизирани говедски еритроцити. Цитосолниот GPx е селено зависен ензим кој најчесто е поврзан со антиоксидативните системи кај говедата (Wichtel, 1998). Всушност, глутатион пероксидазата претставува биолошки активна форма на селенот во млекото (Hojo, 1982; Debski и сop., 1987). Овој ензим ги редуцира липидните хидропероксиди до соодветниот алкохол, а водородниот пероксид до вода. Глутатион редуктазата катализира редукција на глутатион дисулфидот (GSSG) до сулфхидроксилна форма (GSH), која се смета за важен клеточен антиоксиданс. Плазматската глутатион пероксидаза ги штити ткивата од оксидативно оштетување и претставува индикатор за оксидативен стрес (Tuzun и сop., 2002). Всушност, детерминирањето на клеточната или плазматската активност на глутатион пероксидазата се користи како дијагностичка алатка за одредување на селенскиот статус кај млечните крави.

Каталазата претставува неспецифичен антиоксидативен ензим кој е зависен од железото, а кој најчесто се наоѓа во црниот дроб.

Во групата на неензимски антиоксидантни материи припаѓаат токоферолот, β-каротинот, витаминот А и витаминот С (Halliwell, 2007). Пример за антиоксиданси кои го прекинуваат синџирот за создавање на слободни оксидативни радикали е токоферолот, витаминот Е, кој се наоѓа во фосфолипидниот дел на клеточната мембрана. Во споредба со незаситените масни киселини, тој е побрз донатор на електрони за слободните радикали. Доколку незаситените масни киселини самите се

оксидираат би настанале слободни радикали кои би довеле до оксидација на најблиските незаситени масни киселини вклучени во метаболичкиот синцир. Резултат на тоа би било оштетување на клеточната мембрана.

Оксидативната стабилност на млекото претставува рамнотежа меѓу прооксидативните и антиоксидативните фактори (Lindmark-Mansson и Akesson, 2000; Albera и Kankofer, 2009). За да се предвиди процентот на оксидација, потребна е идентификација и карактеризација на овие фактори. Кравјото млеко и колостралното млеко содржат многу биоактивни супстанции, како што се: интерлеукиниот 1 (IL-1 β), интерлеукиниот 2 (IL-2) и тумор некротичниот фактор α (TNF- α). Овие цитокини учествуваат во модулирањето на воспалителниот одговор во млечната жлезда. Неутрофилите изложени на дејството на овие биоактивни супстанции покажуваат посилено оксидативно дејство во процесот на фагоцитоза и неутрализација на патогениот агенс (Sagisawa и соp., 2002). Досега се откриени голем број нискомолекуларни супстанции со антиоксидативно дејство, како што се: аскорбатите, глутатионот, уратите, α -токоферолот (Nielsen и соp., 2001). Gebicki и соp. (2002) истакнуваат дека метионинот и цистеинот имаат ефикасно дејство за редуцирање на оксидативните супстанции во млекото. Доколку во млекото се исцрпи присуството на овие нискомолекуларни антиоксиданси, тогаш оксидацијата на мастите се забрзува и тешко се контролира. Покрај нив, во млекото, како дел од ензимскиот антиоксидативен систем на организмот се присутни и антиоксидативни ензими (каталаза, супероксид дисмутаза, глутатион пероксидаза). Тие активно учествуваат во редукцијата на оксидативните радикали (Lindmark-Mansson и Akesson, 2000). Сепак, нивната важност и релативното учество во оксидативната стабилност на млекото сè уште не е до крај разјаснета.

Состојбите на оксидативен стрес во организмот може да се следат директно, со одредување на концентрацијата на реактивните оксидативни метаболити или индиректно, со одредување на антиоксидансите во циркулацијата или со одредување на вкупниот антиоксидативен потенцијал на организмот (Mandelker и Vajdovich, 2011). Најчести индикатори, односно биомаркери, кои се користат за одредување на оксидативниот статус во крвната плазма и серумот се: реактивните оксидативни метаболити, тиобарбитуратните киселинско-реактивни супстанции, радикалните катјони на N,N диетил пара-фенил диамин, тиол-групите, присуството на формилкиноренин и останати оксидативни продукти настанати како резултат на

оксидацијата на биолошките макромолекули (Turk и сop., 2004; Castillo и сop., 2005). Како индикатори за одредување на антиоксидативниот капацитет на крвната плазма и серумот, најчесто се користат: способноста на плазмата за редуцирање на железото, нивото на α -токоферолот, β -каротенот, витаминот Ц, витаминот Е и селенскиот статус во крвната плазма, активноста на ензимите на оксидативен стрес, како глутатион пероксидазата, супероксид дисмутазата, каталазата и параоксоназата (Bernabucci и сop., 2002; Lykkesfeldt и Svendsen, 2007; Kankofer и сop., 2010a). Способноста на плазмата за редуцирање на железото е параметар за одредување на вкупниот антиоксидативен капацитет на плазмата и претставува неензимски антиоксидативен систем (Dotan и сop., 2004). Во еритроцитите, индикатори за оксидативниот статус се глутатион пероксидазата и внатрешните тиол-групи.

2.3. ЕПИДЕМИОЛОШКИ КАРАКТЕРИСТИКИ НА МАСТИТОТ КАЈ МЛЕЧНИТЕ КРАВИ

Терминот мастит доаѓа од грчкиот збор *mastos*-града и суфиксот *-itis* кој се додава да значи воспалителен процес, што во превод значи воспаление на млечната жлезда (Schalm и сop., 1971). Овој воспалителен процес започнува со навлегување на патогените микроорганизми преку каналот на папилите и подоцна, со нивно размножување во жлезденото ткиво на една или повеќе четвртинки на млечната жлезда. Микроорганизмите за да предизвикаат болест, откако ќе ги поминат анатомските бариери на млечната жлезда, мора да ги совладаат и нејзините клеточни и хуморални одбранбени механизми (Zhao и Lacasse, 2008). Затоа, слободно може да се каже дека маститот настанува како последица на неутрализацијата и уништувањето на патогениот агенс, а што се должи на зголемувањето на бројот на соматските клетки во млекото кои се првата одбранбена линија (Rodriguez и сop., 2000). Физичко-хемиските и микробиолошките промени кои настануваат при тој процес, доведуваат до патолошки промени во ткивото на млечната жлезда и зголемување на бројот на соматските клетки во млекото (Sharma и сop., 2006).

Млечните крави имаат зголемен ризик за појава на мастит во периодот на преминување (транзиција) од гравидитет кон лактација, период кога се најосетливи на оксидативен стрес (Lykkesfeldt и Svendsen, 2007; Sordillo и Aitkens, 2009).

Повеќе од 150 видови грам(+) и грам(-) патогени бактерии се идентификувани како причинители на мастит кај молзните крави (Zadoks и сор., 2011). Сепак, најчесто причинителите на маститот се некои коагулаза позитивни и коагулаза негативни видови од родот *Staphylococcus* и бактерии од родот *Streptococcus*. Не ретко маститот е предизвикан и од некои грам(-) бактерии, особено од *Escherichia coli* (Contreras и Rodriguez, 2011). Освен микробиолошките причини, причина за појава на мастит може да бидат и разни физички трауми или хемиски иританти (Khan и Khan, 2006).

Зависно од начинот на настанување, маститот може да биде контагиозен, предизвикан од контагиозни бактерии или мастит предизвикан од бактерии присутни од непосредната околина во која престојуваат кравите, а како извор на патогени се постилката или шталското ѓубре (White и сор., 2006). Меѓутоа, Zadoks и сор. (2003) укажуваат дека смислата на дихотомност во однос на пренесувањето на патогените причинители на маститот, меѓу двете групи на микроорганизми се губи, бидејќи помеѓу нив постои минорна разлика, додека рамнотежата при инфицирањето на млечната жлезда благо тежнее кон едната или другата група на причинители. Исто така, од епидемиолошки аспект, во практиката не постои јасна границата меѓу контагиозниот и маститот предизвикан од микроорганизми од околината (Piessens и сор., 2012).

Контагиозните микроорганизми предизвикуваат интрамамари инфекции кои се пренесуваат од крава на крава за време на молзењето. Најчесто изолирани контагиозни бактерии се: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* и *Mycoplasma bovis* (Radostits и сор., 2007; Трајчев и сор., 2009).

Бактериите од околината кои предизвикуваат мастит кај кравите се убиквитарни, опортунистички контаминенти на млечната жлезда, чиј примарен резервоар е непосредната околина во која престојуваат молзните крави, а не инфицираната млечна жлезда. Од бактериите присутни во околината, како најчести предизвикувачи на мастит се јавуваат грам(-), колиформни бактерии, пред сè *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Proteus spp.*, *Corynebacterium pyogenes*, *Streptococcus uberis* и *Streptococcus dysgalactiae*, како и коагулаза негативните стафилококи (Schukken и сор., 2005; Taponeм и Pyorala, 2009).

Во однос на влијанието на причинителите на мастит врз воспалителниот одговор на организмот, општата здравствена состојба на кравите, продукцијата и квалитетот на добиеното млеко, микроорганизмите кои предизвикуваат мастит се делат на главни и споредни причинители. Во групата на главни причинители на мастит се вбројуваат: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli* и *Klebsiella spp.* Во групата споредни причинители спаѓаат: *Corynebacterium pyogenes* и коагулаза негативните стафилококи (Djabri и сор., 2002).

Маститот може да се манифестира во клиничка и супклиничка форма. Клиничката форма на маститот се карактеризира со видливи знаци на болеста, како што се: темперираност, болност и зацрвенетост најчесто на една, или поретко, на повеќе четвртинки на млечната жлезда, видоизменето млеко со примеси на крв, гној и згругчувања. Оваа форма на мастит често е проследена со системски здравствени нарушувања, како што се хипертермија, општа слабост и изнемоштеност на животните.

Супклиничката форма на мастит се карактеризира без видливи знаци на воспаление на млечната жлезда и промени на млекото (Roesch и сор., 2007). Загубите во млечната индустрија како резултат на супклиничките форми на мастит се големи, особено ако се има предвид фактот дека интрамамарните инфекции во сувостојниот период неминовно доведуваат до појава на мастит во периодот по телење (Green и сор., 2007).

За споредба, здравите четвртинки на млечната жлезда немаат патолошки промени, а млекото од нив нема патогени микроорганизми и е со „нормален“ број соматски клетки. Бројот на соматските клетки кој ја определува границата меѓу здравото млеко и млекото од крави со супклинички мастит изнесува 250000/ml млеко. Помеѓу бројот на соматските клетки во млекото и млечноста на кравите постои негативна корелација (Hand и сор., 2012).

Микроорганизмите кои спаѓаат во групата на главни причинители предизвикуваат супклинички и клинички форми на мастит, додека микроорганизмите од групата на споредни причинители најчесто предизвикуваат супклинички форми на мастит.

Понекогаш, при рутинското културелно испитување за изолација на патогени микроорганизми, во случаи на клинички мастит, околу 10-40% од засеаните подлоги

може да дадат микробиолошки негативен наод (Persson и сop., 2011). Како можни причини за ова се наведуваат потешкотиите во култивирањето на одредени микроорганизми или пак нивното присуство во материјалот под нивото на детекција.

Во литературата се сретнуваат различни податоци за преваленцијата и инциденцијата на супклиничкиот и клиничкиот мастит кај млечните крави. Ова, пред сè се должи на различните дефиниции за болеста и различните критериуми кои авторите ги користеле во своите истражувања (Vazquez и сop., 2009). Многу често, инциденцијата на супклиничкиот и клиничкиот мастит се поврзува со неговата дистрибуција меѓу четвртинките на млечната жлезда. Според Adkinson и сop. (1993), доколку се исклучи принципот на независност меѓу четвртинките, тогаш тие би биле многу поподложни на инфекција со патогени причинители на мастит отколку што би се очекувало. Концептот за независност помеѓу четвртинките од млечната жлезда засекогаш бил напуштен од страна на Berry и Meaney (2006). Овие автори утврдиле висока зависност помеѓу четвртинките на млечната жлезда при појавата на мастит. Според нив, кога во стадото има поголем број инфицирани четвртинки, тогаш постои и зголемен ризик за заболување на неинфицираните четвртинки.

Понатаму, литературните податоци за инциденцијата на супклиничкиот и клиничкиот мастит се разликуваат во зависност од земјата или регионот каде што се вршени истражувањата. Така, Peeleg и сop. (2000) изнесуваат податоци дека просечната инциденција на клинички мастит во Англија изнесувала 22,8 случаи на 100 крави, годишно. Sviland и Waage (2002), во споредба со претходните автори, утврдиле повисока инциденција на клинички мастит во Норвешка, во периодот од 1992 до 1995 година која изнесувала 49 случаи, на 100 крави годишно со лактациски инцидентен ризик од 32 до 34%. Испитувањата биле направени на 1,2 милиони крави во ризик. Во земјите со најголемо производство на кравјо млеко, како што се на пример Франција и Данска, клиничка форма на мастит имаат околу 20 до 40% од кравите во лактација (Bartlett и сop., 2001). Наспроти овие презентирани податоци кои се однесуваат за инциденцијата на клиничкиот мастит во европските земји, се претпоставува дека дури 50% од кравите во САД и Канада имаат инфицирано една или повеќе четвртинки на млечната жлезда (Hogan и сop., 1989).

Најновите истражувања направени во Република Македонија укажуваат на висока преваленцијата на клиничкиот мастит во фармите за млечни крави, која

изнесувала 85,02 случаи на 100 крави/годишно, со годишен лактациски ризик од 45,86% (Трајчев и сор., 2013; Nakov и сор., 2014).

Во однос на ризикот за инфекција по четвртинки, Gonzalez и сор.(1989) утврдиле дека задните четвртинки имаат поголем инцидентен ризик да заболат од мастит во споредба со предните.

Во истражувањата на Eriskine (2001), на секој случај на клинички мастит во стадото следуваат 20 до 40 случаи на супклинички мастит. Многу други истражувања изнесуваат поголема преваленција на супклиничкиот мастит во споредба со клиничката форма на мастит на фармите за млечни крави. Така, Mungube и сор. (2005) изнесуваат податоци според кои преваленцијата на супклинички мастит на ниво на крава изнесувала 52,3%, односно 32,4% на ниво на четвртинки на млечната жлезда.

Помеѓу литературните податоци за инциденцијата и етиологијата на супклиничките мастити на фармите за млечни крави често постојат значајни разлики. Ова се должи пред сè на потешкото дијагностицирање на супклиничките мастити во споредба со клиничките форми на болеста. Според некои истражувања, преваленцијата на супклиничкиот мастит на фармите за млечни крави изнесува 19,00 - 42,75% заболени крави (Contreras и сор., 1997; Kozacinski и сор., 2002). Преваленцијата на супклиничкиот мастит кај млечните крави во Република Македонија, базирана врз резултатите од истражувањата на Трајчев и сор. (2010), изнесувала 10,85% заболени крави, односно 3,28% четвртинки на млечната жлезда. Зависно од дистрибуцијата на супклиничкиот мастит меѓу четвртинките на млечната жлезда, преваленцијата на задните четвртинки била евидентирана кај 60,61% од заболените крави, наспроти 39,39% на предните четвртинки (Трајчев и Наков, 2010).

Во светот постојат многу литературни податоци за раширеноста на патогените микроорганизми, поврзани со супклиничките и клиничките инфекции на млечната жлезда на кравите. Во минатото, главни причинители на маститот кај молзните крави биле *Streptococcus agalactiae* и *Staphylococcus aureus*. Воведувањето на програмите за контрола на маститот и нивното спроведување на фармите за млечни крави придонесе за намалување на уделот на овие причинители во инфекцијата на млечната жлезда кај кравите, но и за појава на нови причинители. Така, денес се почести се маститите кои се предизвикани од коагулаза негативни *Staphylococcus spp.* и *Streptococcus non-agalactiae* видови (Hillerton и Berry, 2005;

Таронен и Руогала, 2009). До истите сознанија дошле и Huxley и сор. (2002), според кои намалената преваленција на супклиничкиот мастит како резултат на имплементацијата на ефикасни програми за негова ерадикација, го намалува значењето на класичните контагиозни бактерии во неговата етиологија, при што, нивното место го заземаат незначайни патогени микроорганизми, како што се коагулаза (-) *Staphylococcus spp* (CNS) и *Corynebacterium bovis*. Освен тоа, како резултат на неконтролираната употреба на антимикуробните средства во лекувањето на маститот, се создаваат резистентни соеви на најчестите стафилококи кои предизвикуваат мастит.

Во Холандија најчесто изолирани патогени микроорганизми при појава на клинички случаи на мастит биле *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* и *Escherichia coli* (Barkema и сор., 1998). Во нордиските земји најчесто идентификувани причинители на супклинички и клинички форми на мастит биле *Staphylococcus aureus*, коагулаза (-) стафилококи (CNS), *Escherichia coli*, *Streptococcus dysgalactiae* и *Streptococcus uberis* (Ericsson и сор., 2009; Persson и сор., 2011).

Од досегашните истражувања во Република Македонија, најчесто изолирани патогени микроорганизми од случаите на супклинички мастит во фармите за млечни крави се *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp* и *Streptococcus spp* од околината (Трајчев и сор., 2010).

Во литературата може да се најдат различни податоци во однос на преваленцијата на видовите причинители на мастит. Тие се разликуват и зависно од тоа каде се направени истражувањата. Така, на пример, преваленцијата на *Staphylococcus aureus* варира од 3,0 до 3,5% во Финска и Германија до 34,2% и 38,5% во Зимбамбве и Австралија (Kloppert и сор., 1999; Milne и сор., 2002). Во други земји, како што се САД и Бразил, *Staphylococcus aureus* бил детектиран во 7,6%, односно 9,5% од случаите на мастит (Wilson и сор., 1997). Според многу автори, *Streptococcus agalactiae*, кој генерално е познат како чест причинител на мастит кој лесно се контролира, не претставува сериозен проблем во стадата со млечни крави во европските држави (Kalmus и сор., 2011).

Покрај сите гореспоменати патогени микроорганизми кои предизвикуваат мастит кај млечните крави, не треба да се занемарат и останатите, пред сè зоонозни микроорганизми, мувлите и габите, кои во одредени услови може да предизвикаат

воспалителни процеси во млечната жлезда (Sharma и сор., 2012). Микотичниот мастит најчесто се надоврзува на хроничните форми на бактериски мастит, по долготрајна употреба на антимикробни средства.

Маститот се појавува со еднаква зачестеност во текот на целата година (Schukken и сор., 1989). Некои истражувања укажуваат на поголема инциденција на мастит во текот на зимските месеци, споредено со летните месеци (Steenefeld и сор., 2008). Naouina и сор. (2009) во нивните истражувања утврдиле дека преваленцијата на супклинички мастит изнесува 27,1 - 55,2%, при што постоела статистички значајна повисока преваленција во влажните сезони во споредба со сувите сезони во текот на годината. Освен тоа, сезоните во годината имаат влијание и врз доминацијата на видовите причинители на мастит (Waage и сор., 1999).

Во однос на ризикот за појава, може да се каже дека маститот може да настане во кој било период од лактацијата. Сепак, според Valde и сор. (2004), најризичен период за појава на мастит е првиот месец од лактацијата, дури и во добро менаџираните стада. Појавата на мастит во раната лактација влијае врз понатамошната продуктивност на кравите (Hagnestam и сор., 2007). Освен тоа, појавата на мастит во раниот период од лактацијата го зголемува ризикот за нови случаи на мастит во текот на лактацијата и присуство на зголемен број соматски клетки во млекото (De Vliegher и сор., 2004). Други автори пак го наведуваат сувостојниот период на кравите, особено последните две недели пред телење, како значаен ризик-фактор за појава на нови интрамамари инфекции со почетокот на лактацијата (Трајчев и сор., 1997).

Во однос на возраста на кравите, првотелките во раниот период од лактацијата имаат поголем ризик да заболат од мастит во споредба со повозрасните крави (Steenefeld и сор., 2008). Ова се должи на драстичните физиолошки промени во организмот кои настануваат со почетокот на лактацијата.

2.4. ПОВРЗАНОСТ НА ОКСИДАТИВНИОТ СТРЕС И ЗДРАВСТВЕНИТЕ НАРУШУВАЊА НА МЛЕЧНИТЕ КРАВИ

Во периодот три недели пред телење и периодот три недели по телењето, млечните крави се изложени на големи физиолошки промени и метаболички стрес (Grummer, 1995; Goff и Horst, 1997) кои се под контрола на ендокринолошкиот систем (Castillo, 2006). Интензивните метаболички процеси имаат зголемени потреби за кислород. Ова придонесува за зголемено создавање на реактивни оксидативни метаболити (РОМ) и појава на оксидативен стрес. Повеќе автори утврдиле дека млечните крави во раниот постпартален период страдаат од нарушена редокс-хомеостаза. Таа е проследена со намалена активност на антиоксидативните ензими во еритроцитите и крвната плазма. На овој начин доаѓа до зголемување на концентрацијата на РОМ и липидните пероксиди, што претставува индикација за појава на оксидативен стрес (Bernabucci и сор., 2005; Bionaz и сор., 2007).

Во литературните податоци, стресот за време на телењето и започнувањето на лактацијата многу често се поврзува со имунолошката супресија и оксидативниот стрес (Castillo и сор., 2005). РОМ особено се опасни за имунолошките клетки. Тие ја ослабуваат имунолошката реакција на организмот на инфекцијата (Spears и Weiss, 2008), што придонесува за поголема приемливост на кравите на метаболички и инфективни болести во овој период, а што е потврдено во „in vivo“ и „in vitro“ истражувања (Drackley, 1999; Allison и Laven, 2000; Bernabucci и сор., 2005; Castillo и сор., 2005; Sordilo, 2005; Stefanon и сор., 2005; Goff, 2006; Wilde, 2006; Sordilo и сор., 2007). Дополнително, кај повозрасните крави постои зголемена интрацелуларна продукција на кислородни радикали и акумулација на оксидирани макромолекули. Сепак, зголемената инциденција на болестите во периодот на рана лактација не е поврзано само со појавата на оксидативен стрес, туку и со влијанието на генетските и физиолошките фактори, како и со факторите од околината. Сите тие може да имаат негативно влијание врз имунолошкиот систем на кравите (Sordilo, 2005). Ова придонесува за зголемување на нивната предиспозиција за појава на оксидативен стрес.

Некои претходни истражувања укажуваат на улогата на оксидативниот стрес во етиологијата на многу нарушувања кај млечните крави. Во прилог на ова одат и сознанијата дека додавањето на одредени антиоксиданси во исхраната на кравите

може да ја намалат инциденцијата на многу метаболички и инфективни заболувања (Miller и сop., 1993).

Сепак, воспалителните процеси во организмот на кравите играат важна улога во нормалните имунолошки функции, метаболизмот и репродукцијата, но и во патогенезата на инфективните и метаболичните заболувања, што укажува на поврзаноста на физиолошките промени во преодниот период од стелност кон лактација и загубата на антиоксидативниот потенцијал (Wilde, 2006; Sordilo и сop., 2007; Spears и Weiss, 2008). Dantzer и Kelle (2007) успеале да ја објаснат улогата на воспаленијата во здравствените нарушувања во преодниот период кај кравите. Меѓутоа, сè уште недоволно се објаснети патиштата и механизмите на воспалителниот одговор.

Млечната жлезда кај кравите, во периодот пред телење, се подготвува за следната лактација. Во овој период настануваат значајни промени во клеточниот метаболизам кои може да доведат до нарушување на хомеостатската рамнотежа помеѓу продукцијата и неутрализацијата на реактивните оксидативни радикали (Sordillo и Aitkens, 2009). Со почетокот на лактацијата се зголемуваат потребите на мастоцитите за молекуларен кислород, кој е потребен за одвивање на аеробниот метаболизам. Формирањето на слободните радикали во митохондријалниот синџир како нормални крајни продукти на клеточниот метаболизам, доведува до зголемување на потребите за кислород во перипарталниот период. Ова резултира со зголемување на концентрацијата на РОМ во периферната крв на млечните крави (Valko и сop., 2007). На тој начин се зголемува ризикот за појава на оксидативен стрес бидејќи антиоксидативните одбранбени механизми не можат да ги неутрализираат создадените реактивни молекули (Bernabucci и сop., 2005; Sordilo и сop., 2007).

Постојат повеќе литературни податоци кои ја потенцираат поврзаноста на оксидативниот стрес со инфективните заболувања кај млечните крави, а особено со маститот. Во истражувањето на некои автори било утврдено зголемено ниво на липидните пероксиди во еритроцитите на млечни крави со акутна форма на мастит, додека нивото на аскорбатите било пониско (Bernabucci и сop., 2005; Castillo и сop., 2006; Lykkesfeldt и Svendsen, 2007). Според овие автори, кај кравите со мастит настанал оксидативен стрес. Липидните пероксиди, кои настануваат со оксидација на липидите во клетката, се медијатори кои ја активираат воспалителната каскада.

Ова повратно резултира со нарушен метаболизам. Улогата на оксидативниот стрес во патогенезата на маститот кај млечните крави била потврдена со резултати добиени од експерименталните истражувања. Така на пример, експериментален мастит бил инициран со интрамамарна инфузија на патогена *Escherichia coli* (Komine и сор., 2004), како и со ендотоксин на *Staphylococcus aureus* (Weiss и сор., 2004). За разлика од присуството на оксидативните маркери и антиоксидативниот статус на еритроцитите, постојат многу малку литературни податоци за нивното присуство во крвната плазма и млекото од кравите.

Оксидативниот стрес кај животните може да претставува предиспозиција за појава на инфекција. Имено, при појава на оксидативен стрес доаѓа до намалување на нивото на антиоксиданси во циркулацијата. Инаку, тие имаат важна улога во активниот имунолошки одговор. Постојат истражувања кои укажуваат на фактот дека нивоата на витаминот Е и селенот кај кравите влијаат врз појавата на оксидативниот стрес (LeBlanc и сор., 2004; Bouwstra и сор., 2010). Овие две важни состојки во организмот на животните вршат неутрализација на РОМ. На тој начин тие индиректно влијаат врз функционалноста на неутрофилите во крвта. Функционирањето на овој механизам доведува до намалување на инциденција на маститот. Освен тоа, селенот претставува есенцијална компонента на ензимот глутатион пероксидаза, кој пак ги штити мембраните на имунолошките клетки кои учествуваат во одбраната на млечната жлезда од оксидативно оштетување (Cordova-Izquierdo и сор., 2010).

Во прилог на овие сознанија одат и добиените резултати од истражувањата на Hogan и сор. (1992) според кои исхраната на кравите со доволни количества витамин Е и селен доведува до зголемување на фагоцитната активност и оксидативниот метаболизам на неутрофилите во периферната циркулација и млечната жлезда. Во случај на недоволно селен и витамин Е во исхраната на кравите, се намалува способноста на неутрофилите за нивна адхезија на ендотелните клетки на млечната жлезда.

Соодветната исхрана на млечните крави во лактација со дажби кои содржат антиоксиданси го намалува ризикот за појава на мастит и други заболувања во чија патогенеза се споменува оксидативниот стрес (Dibner и сор., 2011). Дајбите со додаток на микроелементи, како што се цинкот, бакарот и селенот придонесуваат за зголемување на антиоксидативниот капацитет на најважните антиоксидативни ензими

- супероксид дисмутаза, глутатион пероксидаза и серумскиот церулоплазмин. Ова имало позитивен ефект во намалувањето на бројот на соматски клетки во млекото.

Сепак, постојат истражувања и со спротивставени сознанија за влијанието на исхраната збогатена со минерали кои се составен дел на антиоксидативните ензими врз здравјето на млечната жлезда и продукцијата на млеко (Siciliano-Jones и сор., 2008).

Одбранбената реакција на млечната жлезда за време на воспалителниот процес има за цел уништување на причинителот, регенерирање на оштетеното ткиво и нормализација на неговата функција (Rainard и Riollot, 2006). Нејзиниот интензитет влијае врз промените во составот, количеството и квалитетот на произведеното млеко.

При појава на мастит, имунолошките клетки во организмот го препознаваат патогениот агенс и се активираат. Активирањето на локалните и системските одбранбени механизми на животните доведуваат до стимулација на повеќе типови имунолошки клетки преку редица последователни реакции. Во овие реакции како медијатори, или сигнални молекули, се појавуваат оксидативните радикали, простагландините и цитокините. Оксидативниот стрес ја зголемува експресијата на цитокините на акутната фаза на инфекцијата, што дополнително влијае врз ткивното оштетување (Oviedo-Boयोso и сор., 2007). Воспалителните цитокини, заедно со тумор некротизирачкиот фактор (TNF- α) и интерлеукините (IL-1 β , IL6 и IL8), играат важна улога во модулирањето на системскиот воспалителен одговор, кој вклучува зголемување на телесната температура, забрзување на работата на срцето и намалување на апетитот (Dantzer и Kelley, 2007).

Слободните радикали кои се насобираат во млечната жлезда во текот на воспалителниот одговор, предизвикуваат тешки оксидативни оштетувања на жлезданото ткиво. Ова има директно влијание врз млекопродукцијата. Локалната активација на имунолошките клетки, како што се макрофагите и неутрофилите, се најважен чекор во настанувањето на акутниот воспалителен одговор. Неутрофилите се доминантни клетки во жлезданото ткиво на млечната жлезда и нејзиниот секрет. Тие сочинуваат 90% од вкупно присутните леукоцити и се одговорни за првичната одбранбена реакција при појава на мастит со бактериска етиологија (Hamed и сор., 2008). Нивното движење кон инфицираната млечна жлезда е стимулирано од

хемиските гласници и хемотактичните агенси кои се ослободуваат од оштетеното ткиво, како што се цитокините, комплементот и простагландините. Активираниите полиморфонуклеарни клетки во инфицираното ткиво ослободуваат токсични реактивни кислородни радикали преку механизмите зависни од кислородот. Всушност, бактерицидниот ефект на неутрофилите се заснова врз респираторните оксидативни процеси. Краен исход на овој процес е создавањето на супероксидните анјони (O_2^-) со помош на ензимот NADPH-оксидаза. Ова, последично предизвикува создавање на други реактивни кислородни радикали, како што се водородниот пероксид, хидроксилниот анјон и хипохлорестата киселина. Сите овие кислородни радикали се опасни за бактериската клетка, но и за клетките на домаќинот. Ledbetter и сор. (2001) укажуваат на фактот дека овие кислородни радикали предизвикуваат ткивни оштетувања и имаат цитотоксичен ефект на секреторните епителни клетки во млечната жлезда. Како последица на ова, се намалува продукцијата на млеко (Barbano и сор., 2006). Од друга страна пак, патогените микроорганизми кои предизвикуваат мастит, поседуваат ензимски антиоксидативен одбранбен систем за заштита од присутните POM (Zhao и Lacasse, 2008).

Оксидативниот стрес, преку токсичното дејство кое оксидативните радикали го имаат врз имунолошките клетки, директно учествува во модулацијата на воспалителната реакција на млечната жлезда. Особено осетливи на оксидативно уништување се лимфоцитите. Ова се случува поради тоа што во нивната клеточна мембрана има релативно големо присуство на слободни масни киселини.

Други автори истакнуваат дека во периодот на рана лактација, кога кравите влегуваат во негативен енергетски баланс и кога настанува брзо акумулирање на POM, доаѓа до редуцирање на функцијата на полиморфонуклеарните клетки и намалување на нивниот потенцијал за фагоцитоза на бактериите (Gilbert и сор., 2007).

Зголемувањето на бројот на леукоцитите и факторите кои учествуваат во коагулацијата на крвта, доведува до пролиферација на сврзоткивните елементи во одводните канали на млечната жлезда. На тој начин доаѓа до губење на секреторната функција на жлезденото ткиво во инфицираниот дел од млечната жлезда. Од друга страна пак, формирањето на сврзоткивните структури при воспалителните процеси во млечната жлезда го спречува продирањето на антибиотиците и другите

медикаменти до инфицираните делови на млечната жлезда. Ова може да претставува сериозен проблем во лекувањето на воспалителниот процес (Jones, 2006).

Млечните крави поседуваат неколку познати ендогени антиоксидативни одбранбени механизми за неутрализација на штетното дејство на РОМ.

Во однос на здравствениот статус на млечната жлезда и резистентноста кон мастит, најпроучувани антиоксиданси се селенопротеините (Sordillo и Aitken, 2009). Додавање на селен во храната ја намалува инциденцијата и јачината на маститот кај млечните крави. Овој ефект на селенот се должи на активноста на антиоксидативните селено зависни ензими. Имено, овие ензими вршат редукција на штетните РОМ и останатите масно-киселински водородни пероксиди во помалку активни молекули на вода и алкохоли. Најчесто поврзуван селенопротеин со антиоксидативната способност на млечните крави е глутатион пероксидазата (Sordillo и *cop.*, 2007). Поради тоа, активноста на овој ензим се користи како дијагностичка алатка за утврдување на селенскиот статус кај млечните крави, како и за откривање на присуството на РОМ во нивниот организам. Според Bruzelius и *cop.* (2007), присуството и на други селенопротеински ензими во крвта и ткивата кај млечните крави, како што се тиродоксин редуктазата и фосфолипид хидропероксид глутатион пероксидазата, има важна улога во контролата на оксидативниот стрес. Покрај нивната улога во редукцијата на РОМ, селенопротеините се важни и за регулирање на клеточниот редокс-статус и експресијата на редокс-регулаторните гени (на пример хеме оксигеназа 1).

Колостралното млеко, но и нормалното кравјо млеко, може да бидат значаен извор на оксидативни радикали поради присуството на макромолекули кои се подложни на пероксидативно оштетување, како и на системи кои генерираат РОМ со цел уништување на присутните микроорганизми (Shoji и *cop.*, 2003). Зголеменото присуство на оксидативни радикали во состојба на оксидативен стрес предизвикува нарушување во квалитетот на колостралното и нормалното млеко. Антиоксидативната активност на млекото се должи на присуството на антиоксидативни ензими, како што се глутатион пероксидазата, супероксид дисмутазата, каталазата, лактопероксидазата и ксантин оксидазата. Освен антиоксидативните ензими, антиоксидативна активност имаат и неензимските антиоксиданси, како што се витаминот Е, каротиноидите и убиквинолот, кои делуваат во липидната фаза на млекото, витаминот Ц, кој делува во водената фаза на

млекото, додека флавоноидите делуваат и во двете фази (Lindmark-Mansson и Akesson, 2000). Според досегашните литературни податоци (Asadpour и сор., 2008; Andrei и сор., 2009), одредувањето на активноста на некои од овие ензими, како што се каталазата и лактопероксидазата, може да се користи како индикатор за здравствениот статус на млечната жлезда кај молзните крави. Активноста на овие антиоксидантни ензими се зголемува со зголемувањето на бројот на соматски клетки во млекото.

Млекото од здрава млечна жлезда содржи ниски концентрации на глутатион пероксидаза. Околу 90% од вкупното количество на овој ензим опаѓа на екстрацелуларната форма. Andrei и сор. (2011) утврдиле дека во млекото добиено од крави со супклиничка форма на мастит постои сигнификантно зголемување на активноста на глутатион пероксидазата во споредба со нормалното млеко. Инаку, функцијата на овој ензим во млекото не е комплетно позната. Сепак, тој врзува околу 30% од вкупниот селен. Присуството на GPX и SOD во млекото се важни за неговата антиоксидативна стабилност. Меѓутоа, досегашните литературни податоци не даваат одговор за поврзаноста на SOD во млекото со појавата на маститот кај млечните крави.

2.5. МОЖНОСТ ЗА ПРЕВЕНЦИЈА НА МАСТИТОТ ПРЕКУ КОНТРОЛА НА ОКСИДАТИВНИОТ СТРЕС КАЈ МЛЕЧНИТЕ КРАВИ

Многубројните досегашни и современи истражувања на маститот, како и направениот прогрес во неговата контрола, не овозможува овој здравствен проблем да го изгуби епитетот „најголем“ кога станува збор за фармите за млечни крави, не само од здравствен туку и од економски аспект (Berry и Hillerton, 2001). Според законските регулативи кои се однесуваат на квалитетот на суровото млеко во ЕУ (Hogeveen и сор., 2010), но и во Република Македонија (Сл. весник на РМ бр 96/2011; Сл. весник на РМ бр 26/2012), фармерите се должни да произведуваат квалитетно и хигиенски исправно млеко кое не претставува опасност за јавното здравје. Според истите законски регулативи, млекото кое не задоволува во однос на квалитетот, млекото кое потекнува од болни животни, животни со клиничка форма на мастит или кое има зголемен вкупен број бактерии и соматски клетки не смее да се користи за консумација од страна на луѓето.

Програмата за следење на заболувањата на млечната жлезда вклучуваат примена на редовни скрининг-методи на кравите во лактација, како што се калифорнија маститис тестот (КМТ), мерењето на кондуктивитетот на млекото и присуството на хлориди и натриум (Pyorala, 2003; Sharma и сор., 2011). Раното откривање на маститот овозможува преземање на проактивни менаџментски мерки за намалување на негативниот ефект од болеста и поголем успех на терапијата (Deluyker и сор., 2005).

Вкупниот број на соматски клетки во млекото, главно леукоцити, кои вклучуваат макрофаги, лимфоцити и неутрофили, претставуваат широко прифатен индикатор за здравствениот статус на млечната жлезда и квалитетот на млекото (Berry и Meaney, 2006). Позитивниот КМТ претставува реален показател за присуство на соматски клетки во млекото, но не секогаш е реална рефлексивна реакција за присуството на специфични патогени причинители на мастит (Bachaya и сор., 2011). Сепак, КМТ претставува дијагностичка алатка за рано откривање на четвртинките од млечната жлезда заболени од супклинички мастит со цел рано започнување со лекување или нивно предвремено засушување (Barkema и сор., 1998; Schukken и сор., 2003). Jones (2006) истакнува дека зголемувањето на вкупниот број на соматски клетки во млекото го зголемува ризикот за контаминација на суровото млеко со патогени микроорганизми, но и ризикот за присуство на резидуи од антибиотици како последица на неконтролираното лекување. Понатаму, зголемениот вкупен број соматски клетки во млекото дава оправдано сомнение за производство на млеко од болни животни во нехигиенски услови, со што се намалува стабилноста на млекото при неговото процесирање.

Најновите достигнувања во биосензорната технологија овозможува континуирано следење на здравствениот статус на млечната жлезда во реално време, на линија на молзење (Hogeveen и сор., 2010). Меѓутоа, сите автори генерално се согласуваат дека не постои индикатор кој би ги опфатил сите аспекти на маститот (Chagunda и сор., 2006). Ако се земат предвид сите потешкотии во навременото дијагностицирање на маститот кај кравите, многу автори се во потрага по нови, специфични биомаркери за негово лесно и рано откривање (Viguiet и сор., 2009). Истовремено, други автори се обидуваат да изнајдат специфични метаболички биомаркери кои би можеле да се искористат како предиктори за појава на мастит кај

млечните крави. Ова ќе овозможи навремено реализирање на програмите за превенција и сузбивање на маститот (Moyses и сop., 2009).

Рутински, сигурна дијагноза на клиничкиот и супклиничкиот мастит се поставува лабораториски, со културелни и биохемиски испитувања за идентификација на причинителите (Smith и сop., 1985; Viguiet и сop., 2009; Dohoo и сop., 2011). Понатаму, врз основа на програмата за терапирање на маститот во текот на лактацијата, која подразбира правење антибиограм и избор на соодветно антиминобно средство, се преминува кон лекување на маститот (Zadoks и сop., 2003; Oliver и сop., 2004; Deluyker и сop., 2005). Понекогаш, како алтернатива на културелните лабораториски техники за идентификација на причинителите на мастит се користи полимеразата верижната реакција (Taponen и сop., 2009). Сепак, таа сè уште е скапа и потешко достапна за рутински анализи. Според Paradis и сop. (2012), сензитивноста на овој метод е пониска во споредба со класичните културелни техники.

Програмите за контрола на маститот во стадата млечни крави ги интегрираат податоците за бројот на соматски клетки во млекото и присуството на патогени микроорганизми кои предизвикуваат мастит. Некои автори (Трајчев и Накoв, 2009) ја потенцираат важноста на примената на стандардните превентивни мерки кои имаат добар ефект во ерадикацијата на контагиозните микроорганизми и превенирањето на новите инфекции, но имаат помал ефект во спречувањето на инфекциите предизвикани од патогените микроорганизми од околината.

Стандардната програма, позната како „Програма за контрола на маститот од пет точки“, вклучува пет принципи (Hillerton и сop., 1995). Најновите препораки за контрола на маститот предизвикан од контагиозни причинители и причинители кои се наоѓаат во околината се содржани во „Програмата за контрола на мастит од десет точки“ (National Mastitis Council, 2001). Составен дел на секоја програма претставува редовното следење на епидемиолошката состојба на маститот, постојаниот мониторинг на здравствената состојба на млечната жлезда на ниво на животно и стадо, примена на зоотехничките и зоохигиенските мерки, спроведувањето на хигиенските мерки пред и по молзење, употребата на антибиотици за лекување на новите случаи во текот на лактацијата, отстранување на хроничните случаи на мастит, антибиотската терапија на сите крави при засушувањето и уредното документирање и чување на податоците (Schneider и сop., 2007). Програмата за

контрола на маститот во стада со млечни крави особено внимание посветува на сувостојниот период, на правилното засушување и практикувањето на примена на терапија за засушување. Според Todhunter и сор. (1991), 60% од новите инфекции на млечната жлезда настануваат во текот на сувостојниот период. Имплементацијата на ефективни мерки за превенирање и контрола на оваа болест во добро менаџираните стада резултира со редуцирање, па дури и ерадикација на маститот.

Антибиотската терапија на заболените животни претставува широко прифатен метод за превенирање и контрола на маститот (Deluyker и сор., 2005). Инфузијата на антибиотици директно во заболените четвртинки на млечната жлезда, особено во периодот пред телење, го намалува ризикот од појава на мастит по телење, дури и во случај на инфекции предизвикани од *Staphylococcus aureus*. Ова понатаму, во текот на лактацијата, резултира со зголемена млечност и намален број соматски клетки во млекото (Oliver и сор., 2004). Меѓутоа, во однос на лекувањето и сузбивањето, голем ризик претставуваат супклиничките мастити. Тие често поминуваат незабележано, не се лекуваат, па затоа млечната жлезда инфицирана со патогени микроорганизми претставува резервоар на инфекцијата (White и сор., 2006).

Зависно од патогениот причинител, антимицробната терапија на маститот кај кравите понекогаш дава слаб резултат во лекувањето. На тој начин, многу од случаите преминуваат во хроничен тек што доведува до исфрлање на кравите од понатамошно искористување. Од друга страна, прекумерената и несоодветна употреба на антимицробните средства за лекување на кравите со мастит може да создаде резистентни соеви на патогени микроорганизми кон одредена група на антибиотици, што може да го комплицира понатамошното лекување (Трајчев и сор., 2009). До денес, антибиотската терапија претставува единствен докажан ефикасен метод за лекување на маститот. Меѓутоа, неконтролираната употреба на антимицробните средства во лекувањето на маститот може да доведе до појава на нивни резидуи во млекото што претставува опасност за јавното здравје на луѓето (Andersson и сор., 2011).

Ако се има предвид фактот дека интрамамарните инфекции најчесто настануваат со навлегување на бактериите преку отворот на каналот на папилите во паренхимот на млечната жлезда, неопходно е правилно и редовно спроведување на

хигиенските принципи, а сè со една единствена цел - намалување на инциденцијата на мастит (Наков, 2011).

Друг потенцијален пристап за намалување на ризикот за појава на маститот вклучува селекција на кравите за резистентност кон мастит и исклучување од експлоатација на кравите осетливи на него. Повеќе студии укажуваат на негативната генетска корелација меѓу здравствениот статус на млечната жлезда и продуктивните карактеристики на кравите. Затоа постои реална потреба од вклучувањето на селекцијата на резистентноста на мастит во одгледувачките програми во современото краварство (Detilleux, 2002).

Според Nakov и сор. (2014), потенцијалните ризик-фактори за појава на клинички мастит на фармите за млечни крави треба да се дел од програмата за превенирање и сузбивање на ова заболување. Во истражувањата на овие автори, како ризик-фактори се посочуваат менаџментот на фармите, сезоната на телење, конформациските карактеристики на млечната жлезда и продуктивноста на кравите.

Идните стратегии за сузбивање на маститот се насочени кон употреба на додатоци во храната, особено во периодот пред телење, и тоа пред сè супстанции со изразено антиоксидативно дејство, како што е на пример витаминот Е, со цел подобрување на имунолошкиот одговор на организмот кон внесениот патоген агенс (Dibner и сор., 2011).

Животинските клетки се способни да толерираат одредено ниво на оксидативен стрес. Оваа толеранција на клетките се должи на зголемената синтеза на антиоксиданси од нивна страна, а што последично има за цел обновување на редокс-потенцијалот на клетката и одржување на нејзината хомеостаза. На тој начин организмот се штити од последиците на оксидативниот стрес. Имено, организмот на животните позитивно реагира на состојбата на умерен оксидативен стрес, помагајќи му во одржувањето на неговите витални клеточни функции, регенерацијата и репарацијата на оштетените ткива, адаптацијата на стрес и преболувањето на болестите. Сепак, доколку оксидативниот стрес ги надмине клеточните одбранбени механизми, настануваат трајни клеточни оштетувања кои на крај доведуваат до клеточна смрт (Milesi, 2006). Во тој контекст, за успешно менаџирање и контрола на оксидативниот стрес е неопходно да се искористат неколкуте ензимски и неензимски антиоксидативни системи. Така на пример, додавањето на антиоксидативни ензими и неензимски антиоксиданси во храната, како што се витамините Е и Ц,

редуцираниот глутатион, алфа-липоичната киселина, N-ацетилцистеинот, флавиноидите и минералите, помага во превенцијата на оксидативниот стрес (Mandelker и Vajdovich, 2011). Воведувањето на антиоксидансите, кои уште можеме да ги наречеме микронутритиенти, во исхраната на млечните крави, особено во постпарталниот период, исто така помага во превенцијата на маститот (Dibner и соp., 2011). Микронутритиентите кои имаат антиоксидантно дејство, а се поврзани со здравјето на млечната жлезда кај кравите се: витамините А и Е, β -каротинот, селенот, цинкот и бакарот. Во прилог на ова одат и сознанијата на други автори кои го потврдиле позитивното влијание на антиоксидансите врз намалување на инциденцијата, времетраењето и текот на маститот кај млечните крави (Mukherjee, 2008).

Исхраната на кравите со храна во која се додадени антиоксиданси непосредно по телење, претставува најсоодветен начин за контрола на РОМ. Сепак, мора да се признае дека сè уште има многу малку достапни информации за улогата на овие додатоци во храната при регулацијата на стресот и реакцијата на него од страна на организмот на преживните животни (Colitti и соp., 2002).

Според Wang и соp. (2010), кравите хранети со високоенергетска храна со додаток на антоксиданси во периодот од 3 дена пред телење до 10 дена по телење покажале повисока активност на антиоксидативните ензими во плазмата во истиот период, споредено со кравите во чија исхрана не биле додадени антиоксиданси. Позитивните ефекти од додавањето на антиоксидативните супстанции во храната за молзни крави се однесуваат на превенцијата на ткивните оштетувања предизвикани од слободните радикали, превенцијата или одложувањето на воспалителните и дегенеративните процеси во организмот преку подобрувањето на функционалноста на имунолошкиот систем, намалената преваленција на некои заболувања и патолошки состојби и подобрувањето на репродуктивните и продуктивните перформанси (Spears и Weiss, 2008; Pedernera и соp., 2010; Sordillo, 2013).

3. ЦЕЛИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО

Оксидативниот стрес претставува реално присутен, но скриен проблем кај човекот и животните. Неговото проучување претставува релативно ново поле на истражување во ветеринарната медицина. Споредено со истражувањата направени во хуманата медицина, многу малку податоци се достапни за улогата на оксидативниот стрес кај преживните животни во патогенезата на различни патолошки состојби.

Во последните десетина години, интересот на научната заедница за улогата на оксидансите и антиоксидансите во физиолошките и патолошките процеси во организмот на животните се зголемува. Досегашните научни податоци даваат придонес во разбирањето на оксидативната хомеостаза и некои физиолошки состојби во организмот на животните. Потенцираното учество на оксидативните радикали како модулатори на воспалителниот одговор, што има директно влијание врз приемливоста на млечните крави на многу болести, меѓу кои и маститот, отвора нови научни хоризонти во проучување на поврзаноста меѓу оксидативниот стрес и состојбите на здравје и болест.

Во литературата постојат многу малку податоци за физиолошката активност на антиоксидативните ензими во крвната циркулација и во млекото кај млечните крави во рана лактацијата и не постојат директни индикатори за тоа кога се појавува оксидативниот стрес. Исто така, нема доволно литературни податоци за поврзаноста на ензимскиот антиоксидативен систем на млечните крави со здравствените нарушувања на млечната жлезда.

Ова, како и негативниот ефект кој го имаат оксидативниот стрес и маститот на благосостојбата и продуктивноста на млечните крави, претставуваат причина за утврдување на целите на ова истражување.

Поконкретно, целите на истражувањето се:

1. Следење на епидемиолошката ситуација со појавата на здравствени нарушувања на млечната жлезда кај кравите во периодот на рана лактација;
2. Идентификација на најчестите патогени причинители на мастит, изолирани во пробите од млеко од четвртинката на млечната жлезда;

3. Следење на продуктивните карактеристики на кравите во периодот на рана лактација, зависно од здравствениот статус на млечната жлезда;
4. Одредување на ензимскиот антиоксидативен статус во крвта и млекото на млечните крави во периодот пред телење и периодот на рана лактација;
5. Утврдување на некои фактори кои влијаат врз активноста на антиоксидативните ензими супероксид дисмутаза и глутатион пероксидаза во крвниот и млечниот серум на кравите во периодот пред телење и периодот на рана лактација;
6. Одредување на поврзаноста меѓу оксидативниот стрес и здравствените нарушувања на млечната жлезда кај кравите, односно можноста активноста на супероксид дисмутазата и глутатион пероксидазата да се користи како биомаркер за рано откривање на маститот;
7. Давање препораки за успешен менаџмент на оксидативниот стрес и маститот кај млечни крави во рана лактација и во услови на интензивно одгледување.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

4.1. ОПИС НА ТЕХНОЛОГИЈАТА НА ЧУВАЊЕ И МОЛЗЕЊЕ НА ОПИТНИТЕ КРАВИ

Реализацијата на поставените цели на истражувањето е направена на фарма за интензивно одгледување високомлечни крави од црно-белата популација, лоцирана во околината на Струмица. Климата во подрачјето на Струмица е изменета континентална со медитеранско влијание. Големината на стадото во фармата изнесува околу 550 млечни крави.

Системот за чување на кравите е слободен, а молзењето централно, во солиден објект - молзилиште. Исхраната на кравите е нормирана (комплетна миксура), во согласност со технологијата за исхрана на млечни крави во периодот на гравидитет и рана лактација. Кравите се молзат два пати на ден, освен отелените крави до два месеци по партус, кои се молзат три пати на ден.

Молзните крави се сместени во една полуотворена штала поставена во правец југоисток-северозапад. Шталата е без сидови, при што просторот меѓу носачите на конструкцијата е затворен со мрежа. Таа е покриена со метална покривна конструкција, без тавански простор. Во средишниот дел на објектот за молзни крави има ходник за манипулација и дотур на храна, широк 4,0 m и ограничен со метални подвижни прегради. На овој начин објектот е поделен на два сегмента. Во секој сегмент има два реда лежишта со димензии 1,50 x 1,10 m. Меѓу редовите лежишта се наоѓа ходникот за изгубрување, широк 3,0 m. Лежиштата меѓусебно се поделени со метални прегради. Тие се повисоки за 30 cm во однос на ходникот за изгубрување. Внатрешниот дел на лежиштата е вдлабнат и исполнет со слама, со што се формира длабока постилка. Редовите со лежишта на средината е прекинат со зона за напојување, која е со површина 1,50 x 3,30, односно 4,95 m². Во тој дел е поставена една поилка на висина 1,10 m, широка 0,45 m и долга 1,50 m.

Молзилиштето претставува солиден објект, и се наоѓа непосредно до објектот за сместување на кравите. Кравите пред да влезат во молзилиштето, поминуваат низ дезинфекциска бариера за чапунките. Подот во влезниот дел на измолзилиштето, пред кравите да застанат на местата за молзење, закосен е со пад од 5 до 6 % кон каналот за изгубрување. Хигиенските мерки за третман на млечната жлезда пред и

по молзење редовно се применуваат, а се состојат од миење со млаз на млека вода, суво бришење со хартија, измолзување на црна подлога на првите млазеви млеко, посебно од секоја четвртинка на млечната жлезда. По завршеното молзење се врши потопување на папилите во раствор на јод. Молзилиштето е организирано дворедно, во типот на рибина коска, со 24 места за молзење на кравите од секоја страна, или вкупно 48 места. Апаратите за молзење и молзилиштето секојдневно, пред и по употреба, се мијат и дезинфицираат. Исто така, секојдневно, по завршеното молзење, затворениот систем на апаратите за молзење се мие со вода загреана на 55 °C, се дезинфицира со кисели и базни раствори за дезинфекција и на крај повторно се проплакнува со вода загреана на 55 °C. Двапати неделно се спроведува детално санитарно миење и дезинфицирање на молзилиштето.

4.2. ДИЗАЈН НА ИСТРАЖУВАЊАТА

Истражувањата направени во овој труд се проспективни, за одреден временски интервал. Тие вклучуваат рандомизиран примерок од N индивидуи, кои се дел од една поголема популација животни. Спроведено е континуирано следење на здравствениот статус на млечната жлезда на кравите вклучени во истражувањето. При тоа, направени се повторливи мерења на маркерите за оксидативен стрес во периодот пред телење и периодот на рана лактација. На реализацијата на предвидените истражувања претходеше едногодишен период на скенирање на фармата. Целта на оваа процедура беше да се постигне правилно дизајнирање и планирање на динамиката и методологијата на истражувањата, особено на колектирањето и подготовката на биолошкиот материјал и калибрирањето на реакциите за одредување на ензимите показатели на оксидативниот стрес.

Групите крави беа формирани по сезони на телење, зависно од очекуваниот датум на телење, во текот на две календарски години, и тоа: сезона 1 - пролет (март, април и мај), сезона 2 - лето (јуни, јули и август), сезона 3 - есен (септември, октомври и ноември) и сезона 4 - зима (декември, јануари и февруари). Заради исклучување на влијанието на надворешните фактори во однос на периодот на телење, кравите во формираните групи се отелувани во период од 7 до 10 дена. Возраста на кравите кои ги формираа групите беше од прва до петта или поголема лактација.

Периодот на опсервација на кравите во групите започнуваше околу 21. ден пред телење до околу 42. ден по телење. Во рамките на овој период по сезони на телење, биолошкиот материјал од опитните крави за направените лабораториски испитувања, беше земен во три периоди, и тоа: во периодот од 21. ден пред телење до телење, во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација и во периодот од 22. ден до 42. ден во лактацијата.

Сите истражувања се базираа врз анализата на појавата на здравствените нарушувања на млечната жлезда на кравите, и тоа нарушената секреција и интрамамарните инфекции, во природни услови, одредување на активноста на антиоксидативните ензими (SOD и GPx) кај сите опитни крави и нивна статистичка обработка.

Податоците за идентификациониот број на кравата, лактацијата по ред во која се наоѓаат и датумот на телење беа нотирани од репродуктивниот картон за секоја крава посебно. Освен тоа, во текот на опсервируаниот период, кај секоја опитна крава беше мерена дневната млечност во тест денот при првата, втората и третата контрола на млеко.

Динамиката на истражувањата беше планирана согласно постоечката технологија на чување и молзење на кравите на фармата.

Здравствениот статус на формираните групи млечни крави се одредуваше со клинички преглед во периодот пред телење, по телење и во периодот до 42. ден од почетокот на лактацијата. При изборот на кравите во опитните групи се водеше сметка кај нив да нема други здравствени нарушувања, особено не метаболички и репродуктивни нарушувања, повреди на екстремитетите и инфективни заболувања. Доколку во текот на опсервируаниот период беше детектирано постоење на некое друго здравствено нарушување, освен мастит, таквите грла беа отстранувани од групите и од понатамошните истражувања.

Здравствената состојба на млечната жлезда кај кравите вклучени во истражувањето, за време на опсервируаниот период, беше следена секојдневно на линијата на молзење со помош на општи методи на клиничкиот преглед: атспекција на млекото и млечната жлезда, палпација на млечната жлезда, како и врз основа на микробиолошка анализа на пробите од млеко од заболените четвртинки на млечната жлезда. Како позитивни на клиничка форма на мастит се регистрираа оние крави кај кои беа присутни видливи промени во млекото (воденесто млеко, присуство на

згрутчувања, крв, гној и друго), проследени со или без промени на млечната жлезда (црвенило, оток, темперираност и болност на зафатените четвртинки од млечната жлезда) и/или нарушување на општата здравствена состојба на животното. При тоа, задолжително беше постоење на микробиолошки позитивен изолат во млекото.

Како скрининг-метода, во одредени временски интервали, за откривање на кравите со нарушена секреција на млечната жлезда и интрамамарните инфекции без видливи знаци на воспаление, беше користен калифорнија маститис тестот (КМТ) (Schalm и Noorlander, 1957). При тоа, беше користен стандарден реагенс (SomaTest) произведен од Farm D.O.O. (Врбановец, Хрватска). Скринингот на здравствениот статус на млечната жлезда се правеше на ниво на четвртинки.

Калифорнија маститис тест. Во вдлабнатинките од тестаторот за КМТ од секоја четвртинка на млечната жлезда беше намолзувано по 2 ml млеко. Во намолзеното млеко додавано е исто толкаво количество реагенс за КМТ кој содржи активна супстанција алкил арил сулфонат, со индикатор бром крезол пурпур. Потоа, мешавината се промешуваше десетина секунди. По 15 секунди е читана реакцијата, посебно за секоја четвртинка од млечната жлезда. Резултатите од читањето се субјективни (Quinn et al. 1999) во зависност од вискозитетот на гелот што се формира со мешање на реагенсот и млекото и промените во бојата на индикаторот.

Врз основа на добиените резултати од КМТ беше направена тријажа на кравите, и тоа: здрави крави „КМТ(-)“ и крави со здравствени нарушувања на млечната жлезда „КМТ(+“). Кравите од групата КМТ(+) крави, понатаму беа делени во две групи во зависност од микробиолошкиот наод, на крави со нарушена секреција на млечната жлезда (НС), кај кои микробиолошкиот наод беше негативен и крави со интрамамарна инфекција (ИМИ), кај кои постоеше микробиолошки позитивен наод кога беа изолирани патогени причинители на мастит.

Зависно од присутниот патоген микроорганизам во млечната жлезда, некои од млечните крави понатаму во текот на лактацијата манифестираа клиничка форма на мастит а некои крави до крајот на лактацијата имаа перзистентна скриена (супклиничка) форма на мастит.

Заради успешна опсервација на кравите кај кои од одделни четвртинки на млечната жлезда беа изолирани патогени причинители на мастит, и покрај направениот антибиограм, до 42. дена во лактација не се вршеше лекување на кравите. По завршување на периодот на опсервација, врз основа на направениот

антибиограм се преземаше соодветно третирање на инфицираните четвртинки на млечната жлезда.

Сензитивноста на КМТ, односно предиктивната моќ на тестот за откривање на вистински заболените четвртинки на млечната жлезда со присутна инфекција беше одредена според образецот:

$$\text{Сензитивност (\%)} = \frac{a}{a+c} \cdot 100$$

во која:

a = број на четвртинки од млечната жлезда кои покажаа позитивна реакција на КМТ и пробите од млеко беа бактериолошки позитивни;

c = број на четвртинки од млечната жлезда кои покажаа позитивна реакција на КМТ, но пробите од млеко беа бактериолошки негативни;

4.3. МЕТОДОЛОГИЈА НА КОЛЕКТИРАЊЕ И ПОДГОТВУВАЊЕ НА БИОЛОШКИОТ МАТЕРИЈАЛ

Активноста на ензимите супероксид дисмутаза (SOD) и глутатион пероксидаза (GPx) беше одредувана во крвниот и млечниот серум.

Крвниот серум беше добиван од пробите од крв кои беа земени од секоја опитна крава посебно, со пункција на v. jugularis, во чисти стаклени серолошки и соодветно обележани епрувети. Пробите беа земани во периодот од 21. ден пред телење до телење, во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата и периодот од 22. до 42. ден во лактацијата. Земените проби од крв до лабораторијата беа транспортирани во мобилно фрижидерче во рок од најмногу 6 часа по земањето. Веднаш по присигнувањето во лабораторијата, серумот од пробите крв се издвојуваше со центрифугирање на 4 °C во центрифуга (HERMLE Z36 НК) на 5000 вртежи во минута, за време од 20 минути. Издвоениот серум се префрлуваше во епендорфи од 1,5 ml во кои се чуваа сè до вршењето на анализите, но не подолго од 2 месеца, на температура од -80 °C.

Млечниот серум беше добиван од пробите млеко кои се земаа посебно од секоја опитна крава во групата, во чисти пластични и соодветно обележани епрувети

на 21. и 42. ден во лактација. Пробите млеко од четвртинките на здравите млечни жлезди беа земени како една, збирна проба. Пробите млеко од четвртинките на млечната жлезда кај кои беше утврдена позитивна реакција на калифорнија маститис тестот (КМТ), со или без видливи знаци на воспаление на млечната жлезда и/или промени на млекото, беа земани како посебна проба. Земените проби млеко до лабораторијата беа транспортирани во мобилно фрижидерче во рок од најмногу 6 часа по земањето. По пристигнување во лабораторијата, пробите млеко се центрифугираа на 4 °C во центрифуга (HERMLE Z36 НК) на 5000 вртежи во минута, за време од 20 минути. По завршеното центрифугирање, на површината се издвојуваше липиден слој, а под него остануваше течна фракција која всушност беше обезмаслено млеко. Заради полесно отстранување на липидниот слој, пробата млеко беше чувана 30 минути на 4 °C, по што липидниот слој се отстрануваше, а седиментот, обезмаслената течна фракција, се префрлаше во друга пластична епрувета, соодветно обележана. Во епруветата со обезмасленото млеко со титрирање се додаваше 1M HCl до pH = 4,6, односно до изоелектричната точка на казеинот кога настанува негова преципитација. По ова, пробата повторно беше центрифугирана на 4 °C во истата центрифуга на 5000 вртежи во минута, за време од 20 минути. По центрифугирањето, на дното од пластичната епрувета се формираше преципитат на казеинот, а над него остануваше супернатантот, односно млечниот серум. Млечниот серум, потоа беше префрлуван во друга чиста пластична епрувета. За да се врати pH-вредноста на добиениот млечен серум на неутралната вредност (pH=7,6), во епруветата со млечниот серум со титрирање се додаваше 1M NaOH. Вака добиениот млечен серум се издвојуваше во епендорфи кои се чуваа на температура од -80 °C, сè до вршењето на анализите, но не подолго од 2 месеци.

4.4. ОДРЕДУВАЊЕ НА АКТИВНОСТА НА ЕНЗИМОТ СУПЕРОКСИД ДИСМУТАЗА (SOD)

Принцип на методот: Активноста на супероксид дисмутазата (SOD) во крвниот и млечниот серум беше одредувана со помош на индиректниот кинетички метод базиран врз истражувањата на Marklund и Marklund (1974) и Gao и сор., (1998), модифициран за изведување во микротитарска плоча, со што вкупниот волумен на реактивната мешавина беше редуциран на 200 µl. Овој метод ја користи

автооксидацијата на пирогалолот под дејство на супероксидните радикали. Пирогалолот или *benzen 1,2,3-triol* претставува бел кристален прав кој е многу силен редуирачки агенс и во алкална средина го апсорбира кислородот при што самиот се оксидира, добивајќи интензивно жолта боја. Ензимот SOD врши неутрализација на супероксидните радикали со што ја инхибира автооксидацијата на пирогалолот во алкална средина. Автооксидацијата на пирогалолот е проследена со раст на апсорбанцата во минута, мерена на 415 nm (A_{415}), овозможувајќи спектрофотометриска визуелизација на активноста на SOD.

Реагенси потребни за изведување на тестот. Реактивната мешавина во вкупниот волумен од 200 μ l содржи:

1. Пуфер (TRIS-HCl, Merck, Germany), финална концентрација во реактивната мешавина 50 mM, pH=8,2 изрегулирана со 1M HCl;
2. Диетилен триамин пентаоцетна киселина (DTPA, Sigma Chemical, USA), финална концентрација во реактивната мешавина 1mM, pH=7,0;
3. Примерок крвен или млечен серум, финално разредување во реактивната мешавина 1:3,33;
4. Pyrogallol ($C_6H_3(OH)_3$, Merck, Germany), финална концентрација во реактивната мешавина 0,2 mM во 10mM HCl;
5. Супероксид дисмутаза - стандард добиен од говедски еритроцити (Cu/Zn-SOD, Sigma Chemical, USA), во концентрација 10 U/ μ l. Ензимот се чуваше на $-20^{\circ}C$.

Сите потребни раствори кои се користеа во реактивната мешавина секогаш се подготвуваа свежи, непосредно пред употребата. За подготвување на пуферот се користеше дејонизирана вода.

Потребна опрема за изведување на тестот:

- ✓ UV/Vis спектрофотометар со кинетичка програма, комора за контролирана температура и филтер за мерење апсорбанца на A_{340} . Работна температура 23-37 $^{\circ}C$. Мерењата беа направени на спектрофотометар Модел Bio-Rad 680 XR, microplate reader;

- ✓ спектрофотометарски микротитарски плочи;
- ✓ пипетори со променлив волумен и типови за еднократна употреба;
- ✓ стаклени лабораториски садови за подготвување на растворите.

Тест-постапка: За секоја анализа претходно се подготвува слепа проба (контрола) која не содржи примерок крвен или млечен серум и која претставува 100% автооксидација на пирогалолот. Спектрофотометарот се приспособува на бранова должина од 415 nm и се програмира да прави 4 исчитувања на апсорбанцата во интервали од 60 секунди. Претходно се протресува микротитарската плоча и почетно се одложува отчитувањето за 15 секунди. Реакцијата се одвива на температура од 25 °C при pH= 8,2 а започнува во моментот кога се додава супстратот (пирогалол). Во бунарчињата од микротитарската плоча се додаваат реагенси според шемата дадена во Табела 1.

Табела 1. Протокол за изведување на тестот за одредување на активноста на SOD (μ l)

	Пуфер	DTPA	Примерок	Cu/Zn-SOD	Pyrogallol
Слепа проба	160	20			20
Калибрација	140	20		20	20
Анализа	100	20	20		20

Дефиниција за активност: Една единица активност на SOD е дефинирана како количество ензим потребно да изврши 50% инхибиција на автооксидацијата на пирогалолот. Активноста на SOD се изразува како U/ml крвен или млечен серум.

$$I (\%) = ((\Delta A_{415} \text{ слепа проба} - \Delta A_{415} \text{ примерок}) / \Delta A_{415} \text{ слепа проба}) \cdot 100 \text{ (Образец 1)}$$

во која:

$I (\%)$ = процент на инхибиција на автооксидацијата на пирогалолот

$\Delta A_{415} \text{ слепа проба}$ = промена на апсорбанцата на слепата проба во минута и

$\Delta A_{415} \text{ примерок}$ = промена на апсорбанцата на примерокот во минута.

Одредувањето на активноста на SOD во реактивната мешавина се направи врз основа на логаритамската функција добиена од стандардната крива во која беа користени познати концентрации од стандардот на Cu/Zn-SOD добиен од говедски еритроцити, според Образецот 2:

$$y = a \cdot \ln(\text{SOD}) + b \text{ (Образец 2)}$$

во која

y = процент на инхибиција на автооксидацијата на пирогалолот;

a, b = коефициенти на логаритамската функција;

$\ln(\text{SOD})$ = декаден логаритам од активноста на ензимот супероксид дисмутаза која врши 50% инхибиција на автооксидацијата на пирогалолот.

од овде:

$$\ln(\text{SOD}) = \frac{y-b}{a} \text{ (Образец 3)}$$

$$\text{SOD (U/ml)} = \text{Exp.} \left(\frac{y-b}{a} \right) \text{ (Образец 4)}$$

Од Образецот 4, за пресметување на активноста на SOD во реактивната мешавина мора да се коригира крајното разредување на примерокот во мешавината и да се изврши конвертирање на единицата U во mU , односно:

$$\text{SOD (mU/ml)} = \text{Exp.} \left(\frac{y-b}{a} \right) \cdot DF \text{ (Образец 5)}$$

во која:

D = разредување на примерокот крвен односно млечен серум (1:3,33) во реактивната мешавина;

F = 1:1000 фактор за конвертирање на U во mU .

Специфичната активност на SOD изразена во mU/mg протеини беше пресметана според Образецот 6:

$$\text{специфична активност на SOD (mU/mg протеини)} = \text{SOD} / \text{P (Образец 6)}$$

во која:

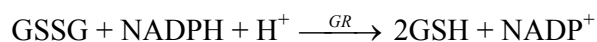
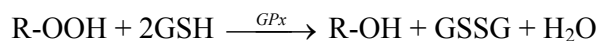
SOD = активност на SOD (mU/ml);

P = Концентрација на вкупни протеини во крвниот и млечниот серум (mg/ml).

Одредувањето на активноста на супероксид дисмутазата во крвниот и млечниот серум на кравите беше направено во Биохемиската лабораторија на Институтот за биологија на Природно-математичкиот факултет при Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје.

4.5. ОДРЕДУВАЊЕ НА АКТИВНОСТА НА ЕНЗИМОТ ГЛУТАТИОН ПЕРОКСИДАЗА (GPx)

Принцип на методот: Активноста на глутатион пероксидазата (GPx) во крвниот и млечниот серум на кравите беше одредувана со помош на индиректниот кинетички метод базиран врз истражувањата на Paglia и Valentine (1967), модифицирана според Chen и sor. (2000) за изведување во микротитарска плоча, со што вкупниот волумен на реактивната мешавина беше редуциран на 200 μ l. Накратко, GPx ја катализира редуцијата на слободниот водороден пероксид (H_2O_2) во вода (H_2O), додека органските пероксиди (R-O-O-H) ги редуцира до соодветен стабилен алкохол (R-OH) употребувајќи го глутатионот (GSH) како извор на редуциран еквивалент:



Во оваа реакција, GPx го користи глутатионот како донатор на електрон за да ја обнови редуцираната форма на селеноцистеинот (активен дел од молекулата на глутатион пероксидазата), при што го конвертира редуцираниот глутатион (GSH) во оксидиран глутатион (GSSG) и настанува редуцирање на липидните хидропероксиди до соодветни алкохоли, или ја катализира реакцијата при која водородниот пероксид (H_2O_2) се редуцира во вода (H_2O). Сите форми на GPx покажуваат специфичен афинитет кон глутатионот како извор на редуциран еквивалент. Фосфолипид-хидропероксидниот GPx претставува единствената форма која покажува значајна активност кон естерифицираните фосфолипиди и холестеролот во клеточната мембрана. Оксидираниот глутатион, настанат по редукцијата на органските пероксиди од страна на GPx, се рециклира во неговата редуцирана форма со помош на ензимот глутатион редуктаза, а како донатор на електрон се користи NADPH. Оксидацијата на NADPH во $NADP^+$ е проследено со намалување на апсорбанцата мерена на 340 nm (A_{340}), овозможувајќи спектрофотометриска визуелизација на активноста на глутатион пероксидазата. Намалувањето на апсорбанцата во единица време е правопрпорционално со активноста на ензимот. Реакцијата катализирана со GPx е ограничувачка во системот на реакции, со што се овозможува спектрофотометриски да се проследи активноста на GPx.

Постојат неколку изоензими на GPx на различни локации во клетките кои користат различен специфичен супстрат. Генерално, глутатион пероксидазите користат широка лепеза на органски пероксиди како супстрат. Во реакцијата како супстрат беше користен cumene Hydroperoxid (кумен водороден пероксид) - cH_2O_2 ($C_6H_5C(CH_3)_2OOH$). Овој супстрат се користи во реакциите кога се одредува вкупната активност на GPx (селенозависен и неселенозависен). Овој супстрат беше соодветен за анализата бидејќи спонтано слабо реагира со GSH и не се метаболизира од каталазата. Доколку треба да се одреди само присуството на селенозависниот GPx, тогаш како супстрат се користи tert-butyl Hydroperoxid (терт-бутил водороден пероксид) а во реактивната мешавина се додаваат редуцирачки агенси, како што се dithiothreitol или mercaptoethanol. Реакцијата за одредување на активноста на глутатион пероксидазата започнува во моментот на додавање на супстратот.

Реагенси потребни за изведување на тестот. Реактивната мешавина во вкупниот волумен од 200 μ l содржи:

1. Пуфер (калиум дихидроген фосфат - KH_2PO_4 , Merck, Germany), финална концентрација во реактивната мешавина 50mM, pH=7,6 изрегулирана со 1M KOH;
2. Етилен диамин пентаоцетна киселина (EDTA, Merck, Germany), финална концентрација во реактивната мешавина 5mM, pH=7,6 изрегулирана со 1M NaOH;
3. Примерок крвен серум разреден 1:25 во пуфер, односно финално разредување во реактивната мешавина 1:2500 или примерок млечен серум разреден 1:8 во пуфер, односно финално разредување во реактивната мешавина 1:800;
4. Редуциран глутатион (GSH, Sigma Chemical, USA), финална концентрација во реактивната мешавина за одредување на активноста на GPx во крвниот серум 2 mM, односно финална концентрација во реактивната мешавина за одредување на активноста на GPx во млечниот серум 1 mM;
5. Редуциран β -никотинамид-аденин-динуклеотид фосфат (NADPH, Sigma Chemical, USA), финална концентрација во реактивната мешавина 0,25 mM;
6. Глутатион редуктаза (GR, Sigma Chemical, USA), финална активност во реактивната мешавина 1 U/ml;
7. Супстрат cumene Hydroperoxid - cH_2O_2 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{OOH}$, Merck, Germany), финална концентрација во реактивната мешавина 1,5 mM.

Сите потребни раствори кои се користеа во реактивната мешавина секогаш се подготвуваа свежи, непосредно пред употребата. За подготвување на пуферот беше користена дејонизирана вода.

Потребна опрема за изведување на тестот:

- ✓ UV/Vis спектрофотометар со кинетичка програма, комора за контролирана температура и филтер за мерење апсорбанца на A_{340} . Работна температура 23-37 $^{\circ}\text{C}$. Мерењата беа направени на спектрофотометар Модел Bio-Rad 680 XR, microplate reader;
- ✓ спектрофотометарски микротитарски плочи;

- ✓ пипетори со променлив волумен и типови за еднократна употреба;
- ✓ стаклени лабораториски садови за подготвување на растворите.

Тест-поставка: За секоја анализа претходно се подготвува слепа проба (контрола) која не содржи супстрат Cumene Hydroperoxid (кумен водороден пероксид), со цел да се исклучи ендегената активност на ензимите од примерокот кои користат NADPH. Спектрофотометарот се приспособува на бранова должина од 340 nm и се програмира да прави 4 исчитувања на апсорбанцата во интервали од 60 секунди. Претходно се протресува микротитарската плоча и почетно се одложува исчитувањето за 15 секунди. Реакцијата се одвива на температура од 37 °C, pH=7,6 а започнува во моментот кога се додава супстратот. Во бунарчињата на микротитарската плоча се додаваат реагенси според шемата дадена во Табела 2.

Табела 2. Протокол за изведување на тестот за одредување на активноста на GPx (μl)

	Пуфер	EDTA	Примерок	GSH	NADPH	GR	cH2O2
Слепа проба	120	20		20	20	20	
Анализа	88	20	2	20	20	20	30

Ензимската реакција се визуелизира со додавање на супстрат (cumene Hydroperoxid) и се мери апсорбанцата (A_{340}) на 340 nm бранова должина.

Дефиниција за активност: Моларниот екстинзионен коефициент за NADPH на 340 nm бранова должина изнесува $0,00622 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Една единица на глутатион пероксидаза овозможува формирање на $1,0 \mu\text{mol/L NADP}^+$ од NADPH за време од една минута, на pH=7,6 и температура од 37°C, во присуство на редуциран глутатион, глутатион редуктаза и супстрат cumene hydroperoxid.

Според законот на Beer - Lambert (Swinehart, 1962) кој се однесува на апсорпцијата на светлината кога таа поминува низ различни материјали, постои логаритамска зависност меѓу пренесувањето на светлината низ одредена материја, нејзиниот апсорпциски коефициент и должината на патеката на светлосниот зрак. Законот укажува дека фракцијата која се апсорбира од секој слој на реактивната мешавина во реакцијата е иста. Од овде, апсорпцискиот коефициент може да се изрази како производ од моларниот апсорпциски коефициент (моларен екстензионен коефициент) на апсорберот, во случајот NADPH, неговата моларна концентрација и ефективната должина на патеката на светлосниот зрак:

$$\Delta A_{340} = \varepsilon \cdot \ell \cdot \Delta c \text{ (Образец 1)}$$

во која:

$\Delta A_{340} = \Delta A_{340} \text{ примерок} - \Delta A_{340} \text{ слепа проба}$ (нето-промена на апсорбанцата на примерокот во минута, што претставува разлика од промената на апсорбанцата на примерокот во минута и промената на апсорбанцата на слепата проба во минута);

ε = моларен екстензионен коефициент кој претставува мерка за количество светлина апсорбирана на единица концентрација, за NADPH на 340 nm бранова должина изнесува $0,00622 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$;

$\ell = 0,7 \text{ cm}$ (фактор за корекција на ефективната должина на патеката на светлосниот зрак низ реактивната мешавина во бунарчињата од микротитарската плоча во кои се одвива реакцијата.

$\Delta c = 1 \text{ mU/ml GPx}$ што одговара на $1 \text{ nmol NADPH/min/ml}$

Од овде следува:

$$\Delta c = \Delta A_{340} / \varepsilon \cdot \ell \text{ (Образец 2)}$$

Од Образецот 2, за пресметување на активноста на GPx во реактивната мешавина мора да се коригира крајното разредување на примерокот, односно:

$$\Delta c = (\Delta A_{340} / \varepsilon \cdot \ell) \cdot DF \text{ (Образец 3)}$$

во која:

D = разредување на примерокот крвен серум 1:25, односно примерокот млечен серум 1:8, пред додавање во реактивната мешавина;

F = разредување на примерокот 1:100 во реактивната мешавина;

Специфичната активност на GPx изразена во mU/mg протеини беше пресметана според Образецот 4:

$$\text{специфична активност на GPx (mU/mg протеини)} = \text{GPx} / \text{P (Образец 4)}$$

во која:

GPx = активност на GPx (mU/ml);

P = Концентрација на вкупни протеини во крвниот и млечниот серум (mg/ml).

Ограничување на тестот:

- ✓ Промената на апсорбанцата во минута, мерена на 340 nm бранова должина треба да биде во границите од 0,035 до 0,15, што одговара на активност на ензимот во границите од 5,6 до 24 mU/ml;
- ✓ Намалувањето на апсорбанцата во минута треба да покажува добра линеарност;
- ✓ Понекогаш може да се случи погрешно исчитување на резултатот на реакцијата што може да е последица на вкрстена реакција меѓу активноста на GPx и други ензими кои како донатор на електрон го користат NADPH. Ова особено се случува кога како материјал за испитување се користи екстракт од ткива, што не беше случај во овие истражувања. Затоа, редовно се врши тестирање на слепа проба кога во реактивната мешавина не се додава супстрат cumene Hydroperoxid (cH₂O₂), со цел да се одреди неспецифичната оксидација на NADPH.

Одредувањето на активноста на глутатион пероксидазата во крвниот и млечниот серум на кравите беше направено во Биохемиската лабораторија на Институтот за биологија на Природно-математичкиот факултет при Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје.

4.6. ОДРЕДУВАЊЕ НА ВКУПНИТЕ ПРОТЕИНИ ВО КРВНИОТ И МЛЕЧНИОТ СЕРУМ

Со цел одредување на специфичната активност на ензимите глутатион пероксидаза и супероксид дисмутаза изразена како mU/mg протеини, беа одредени вкупните протеини во пробите на крвен и млечен серум, земени во истите периоди како и примероците за биохемиска анализа, односно во периодот од 21. ден пред телење до телење, во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата и периодот од 22. до 42. ден во лактацијата. Вкупните протеини беа одредени со помош на колориметриски метод базирана врз принципот на Биуретната реакција (Josephson и Gyllensard, 1957). Принципот на реакцијата се базира врз врзувањето на пептидните врски на протеините за јоните на бакарот (Cu^{2+}) во алкален раствор при што се формира синовioletов комплекс кој е стабилен 30 минути. Реактивната мешавина се остава 10 минути на температура од $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, по што интензитетот на бојата на комплексот се одредува спектрофотометриски со мерење на апсорбанцата на 540 nm . Интензитетот на бојата е правопрпорционален со содржината на вкупни протеини во испитуваниот примерок. Тартаратите во реактивната мешавина се додаваат како стабилизатори, калиевиот јодид служи за да се спречи авто-редукцијата на базниот комплекс на бакарот. Како стандард беше користен раствор од говедски албумин кој содржи 40 g/l протеини. Вкупните протеини беа пресметувани според образецот:

$$\text{Вкупни протеини (g/l)} = \frac{A_p}{A_s} \cdot 40$$

A_p = Апсорбанца на примерокот;

A_s = Апсорбанца на стандардот и

40 = Концентрација на протеини (g/l) во стандардот.

4.7. МЕТОДОЛОГИЈА НА КОЛЕКТИРАЊЕ, ПОДГОТВУВАЊЕ И МИКРОБИОЛОШКА АНАЛИЗА НА ПРОБИТЕ МЛЕКО

Пробите млеко за микробиолошка анализа од четвртинките на млечната жлезда кај кои беше утврдена позитивна реакција на КМТ беа земани во истите периоди како и примероците од млеко земани за одредување на ензимите.

Процедурата за земање на проба млеко за микробиолошка анализа се вршеше асептично, по следниов редослед: миење на млечната жлезда со млека вода, сушење на млечната жлезда со хартиени крпи за еднократна употреба, дезинфекција на врвовите на папилите со попрскување со 76% етил алкохол, по десетина секунди, по претходно измолзување на првиот млаз во посебен сад, намолзување по околу 5 ml млеко во стерилни и соодветно обележани епрувети. Стерилната епрувета се отвораше директно под папилата на четвртинката од млечната жлезда во коса положба. Потоа епруветите се затвораа и оставаа во транспортно фрижидерче на температура на одржување од 2 до 8 °C. Во рок од најмногу 6 часа се транспортираа во лабораторија.

Веднаш по пристигнувањето во лабораторијата од секоја проба млеко извршено е засејување со еза за еднократна употреба (стандардно количество од 10 µl) во петриеви плочи на комерцијална подлога - колумбија крвен агар (Oxoid – UK), збогатена за изолација и идентификација на одредени соеви патогени микроорганизми. Паралелно со ова засејување, вршено е засејување на материјалот на комерцијална хромогена STRB подлога (BioMérieux - France) во петриеви плочи, за раст и изолација на група бета хемолитичен *Streptococcus spp.* од групата В (Smith и сор., 1985).

Сите петриеви плочи со засејани хранителни подлоги се инкубираа во аеробни услови 48 часа на 37 °C, и уште 24 часа на собна температура за раст на габите. Понекогаш, за утврдување на евентуално присуство на габички во пробите млеко, инкубацијата траеше до 5 дена.

Идентификацијата на израснатите колонии на микроорганизми се вршеше соодветно на стандардните микробиолошки процедури.

Идентификација на *Streptococcus agalactiae*. Колониите на *Streptococcus agalactiae* на колумбија крвниот агар беа β-хемолитички, каталаза (-), резистентни на бацитрацин (се користеше за диференцирање од *Streptococcus pyogenes*, кои се

најчесто осетливи на бацитрацин). Колониите добиени со култивирање на STRB подлога (BioMérieux - France) беа розово обоени. За крајна потврда на групата стрептококи беше користен латекс аглутинацискиот SlidexStrepto - тест (BioMérieux - France), каде што *Streptococcus agalactiae* не дава аглутинација.

Идентификација на *Staphylococcus aureus*. Колониите на Колумбија крвниот агар кои со растот наликуваа на колониите на *Staphylococcus aureus* и беа каталаза (+), понатаму беа испитувани со помош на DNA-аза тест. Со позитивен DNA-аза тест се разликува *Staphylococcus aureus* од другите претставници на родот *Staphylococcus*.

Идентификација на *Escherichia coli*. Колониите на колумбија крвниот агар кои со растот наликуваа на колониите на *Escherichia coli* беа идентификувани со класична IMViC (индол, метил-црвено, Voges-Процкорова и цитратна реакција; +++-) и супкултура на комерцијална хромогена UTI подлога (Oxoid - UK), на која даваат карактеристични розови колонии.

Идентификација на *Pseudomonas aeruginosa*. Карактеристичните колонии на *Pseudomonas aeruginosa* израснати на колумбија крвниот агар (пигментирани колонии со мирис на липа) беа потврдени со оксидаза тест.

Идентификација на *Enterococcus spp.* Карактеристичните колонии за родот *Enterococcus*, израснати на колумбија крвниот агар, беа докажани со реакција на хидролиза на ескулин.

Идентификација на израснатите габички и мувли (*Aspergillus spp.*, *Candida spp.*). Останатите израснати колонии на колумбија крвниот агар беа супкултивирани на комерцијална хромогена CALB подлога (Oxoid - UK) и беа подготвувани микроскопски препарати. Супкултивираните колонии на *Candida albicans* на хромогената CALB подлога даваат сини колонии, додека соевите *Candida non-albicans* израснуваат во бели колонии. Памучестите колонии кои израснуваа на колумбија крвниот агар и кои со својот раст наликуваа на мувли, беа супкултивирани на Saburo подлога. На оваа подлога, видовите мувли од родот *Aspergillus* даваат пигментирани колонии (на пример, *Aspergillus niger* дава црни, зрнести колонии). Конечната идентификација на израснатите мувли беше направена со подготвување на микроскопски препарати на кои се гледаат карактеристични клеточни структури (септирани хифи, конидиофор со фијалиди и конидиоспори, специфично распоредени кај различните видови аспергилуси).

Толкување на добиените резултати. Како негативни проби млеко беа означувани оние кај кои немаше изолација на патогени микроорганизми што предизвикуваат мастит.

Како нормален наод беа означувани и пробите кај кои беше детектирано присуството на лактобацили или коагулаза (-) стафилококи, дифтероиди и условно патогени микроорганизми во траги, а кои се дел од нормалната микрофлора на кожата.

Како позитивни проби од млеко на патогени причинители на мастит беа означувани оние кај кои беше изолирана барем 1 CFU (colony-forming unit) на *Streptococcus agalactiae* или останати патогени претставници на родот *Streptococcus* кои предизвикуваат мастит (*Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*), потоа изолати на *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* или 5 CFU на останати патогени микроорганизми кои предизвикуваат мастит кај млечните крави.

Доколку постоеше сомнение во однос на наодот, беше користен автоматизиран систем за точна идентификација на видовите микроорганизми - VITEK (BioMérieux - France), според препораките на производителот.

Антимикробна осетливост на изолираните причинители. На сите изолирани причинители на мастит, им беа направени тестови за нивна осетливост на антимикробни средства (антибиограм) со диск-дифузиониот метод на Mueller-Hinton-ов агар. За таа цел беа користени комерцијални антибиотски дискови (Oxoid - UK), и тоа: Penicillin (10 IU), Ampicillin (10 µg), Amoxicillin (10 µg), Amoxyclav (20/10 µg), Imipenem (10 µg), Meropenem (10 µg), Vancomycin (30 µg), Piperacilin-tazobactam (100/10 µg), Gentamicin (10 µg), Amikacin (30µg), Cefadroxil (30 µg), Cefalexin, Cefpodoxime (10 µg), Cefuroxim (30µg), Ceftriaxon (30µg), Cefotaxim (30 µg), Ceftazidim (30µg), Cefixim (5 µg), Cefepim (30 µg), Clindamycin (2 µg), Erythromycin (15 µg), Azithromycin (15 µg), Clarithromycin (5 µg), Co-trimoxazol (1,25/23,75 µg), Ciprofloxacin (5 µg), Moxifloxacin (5µg) и Colistin (10 µg).

Интерпретацијата на антимикробната осетливост на изолираните причинители на мастит беше направена според упатството на производителот, во зависност од ширината на зоната на инхибиција, која беше мерена во милиметри, а во согласност со препораките на National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2002). Осетливоста на микроорганизмите беше означувана како осетливи

(S), умерено осетливи (I) и неосетливи или резистентни (R) кон испитуваните антимикробни средства.

Микробиолошките испитувања се вршени во Институтот за микробиологија и паразитологија на Медицинскиот факултет во состав на Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје.

4.8. СТАТИСТИЧКА ОБРАБОТКА НА ПОДАТОЦИТЕ

Статистичката обработка на податоците беше направена со современи статистички процедури, а сè со цел да се интерпретираат резултатите на најсоодветен начин. На почетокот со дескриптивната анализа на фреквенциите се опишаа параметрите, дисперзијата на податоците зависно од факторите на влијанијата како и откривање на евентуалните ненамерни грешки, направени при внесување на податоците. Добиените резултати се претставени како просек \pm стандардна грешка на аритметичката средина ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$), медијана и процентуално.

Испитуваните параметри за активноста на антиоксидативните ензими во крвниот и млечниот серум на кравите беа анализирани независно, при што беа одбрани модели во кои беа вклучени независните променливи и коваријаблите на променливите кои беа логично поврзани со зависната променлива. Статистичката обработка на специфичната активност на SOD во крвниот серум на кравите беше направена преку линеарен мешан модел (Модел 1) каде што случаен фактор беше индивидуалното влијание на кравата а фиксни фактори беа сезоните во годината кога се отелени кравите детерминирани како 4 сезони во 2 експериментални години, периодите пред и по телење кога се земени пробите од крв и млеко (21. ден пред телење, периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација и периодот од 22. до 42. ден во лактација), лактацијата по ред на кравите и ефектот на здравствениот статус на кравите (КМТ(-) крави, крави со нарушена секреција на млечната жлезда и крави со интрамамарна инфекција). За анализа на специфичната активност на SOD и GPx во млечниот серум на кравите Моделот 1 беше надграден со регресиски коефициент за дневната млечност во тест-денот при првата и втората контрола на млеко како коваријабла (Модел 2). Натаму, при анализа на GPx во крвниот серум на кравите со Модел 3 од појдовниот Модел 1 беше додадена линеарна регресија за специфичната активност на SOD во крвниот серум на кравите.

Покрај основната статистичка анализа за параметрите од интерес, беа оценети и средните вредности за факторите вклучени во моделот, преку тестирање на нивните разлики (Post Hoc анализа) со користење на тестот Бонферони (Bonferroni).

Линеарен мешан модел 1:

$$Y_{ijklm} = \mu + a_i + YS_C_j + L_k + M_l + T_m + e_{ijklm}$$

Y_{ijklm} = вредност за специфичната активност на SOD во крвниот серум на кравите;

μ = општ просек;

a_i = случаен ефект од влијанието на кравата;

YS_C_j = ефект на сезоната во годината на телење ($j = 112, 212, 312, 412, 113, 213, 313, 413$);

L_k = ефект на лактацијата по ред ($k = 1, 2, 3, 4, 5$);

M_l = здравствен статус на млечната жлезда ($l = 0, 1, 2$);

T_m = период кога се земани примероците од крв ($m = -21, 21, 42$);

e_{ijklm} = грешка на моделот.

Линеарен мешан модел 2:

$$Y_{ijklmn} = \mu + a_i + YS_C_j + L_k + M_l + T_m + b_n(TDM) + e_{ijklmn}$$

Y_{ijklmn} = вредност за специфичната активност на SOD и GPx во млечниот серум на кравите;

μ = општ просек;

a_i = случаен ефект од влијанието на кравата;

YS_C_j = ефект на сезоната во годината на телење ($j = 112, 212, 312, 412, 113, 213, 313, 413$);

L_k = ефектот на лактацијата по ред ($k = 1, 2, 3, 4, 5$);

M_l = здравствен статус на млечната жлезда ($l = 0, 1, 2$);

T_m = период кога се земани примероците од млеко ($m = 21, 42$);

$b_n(TDM)$ = регресиски коефициент за дневната млечност при контрола на млекото во тест-денот;

e_{ijklmn} = грешка на моделот.

Линеарен мешан модел 3:

$$Y_{ijklmn} = \mu + a_i + YS_C_j + L_k + M_l + T_m + b_n(SOD) + e_{ijklmn}$$

Y_{ijklmn} = вредност за специфичната активност на GPx во крвен серум;

μ = општ просек;

a_i = случаен ефект од влијанието на кравата;

YS_C_j = ефект на сезоната во годината на телење ($j = 112, 212, 312, 412, 113, 213, 313, 413$);

L_k = ефектот на лактацијата по ред ($k = 1, 2, 3, 4, 5$);

M_l = здравствен статус на млечната жлезда ($l = 0, 1, 2$);

T_m = период кога се земани примероците од крв ($m = -21, 21, 42$);

$b_n(SOD)$ = регресиски коефициент за специфичната активност на SOD во крвниот серум на кравите;

e_{ijklmn} = грешка на моделот.

Конечно, меѓусебната зависност на специфичната активност на SOD и GPx во крвниот и млечниот серум на кравите беше проверена и преку Пирсоновиот коефициент на корелација.

5. РЕЗУЛТАТИ

5.1. ОПИС НА ИСПИТУВАНАТА ПОПУЛАЦИЈА МЛЕЧНИ КРАВИ

Истражувањата направени во овој труд се проспективни и лонгитудинални, а се направени во текот на две календарски години.

Теренските истражувања се направени на фарма за одгледување млечни крави и вклучуваат рандомизиран примерок на животни групирани зависно од сезоната на телење. Кравите кои беа вклучени во истражувањето беа од прва до петта или поголема лактација. Периодот на опсервација за секоја крава, вклучена во истражувањето, започнуваше приближно 21. ден пред телење до приближно 42. дена по телење. Во текот на целиот период беше континуирано следен здравствениот статус на млечната жлезда. Собраните податоци се анализирани во текот на две календарски години, но и по сезони во годината.

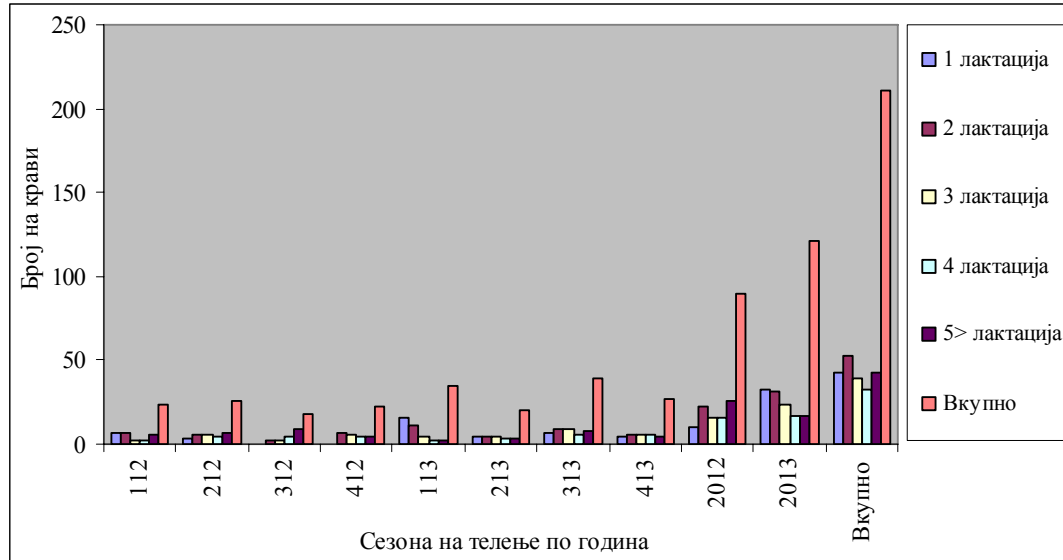
Во истражувањата вкупно беа вклучени 211 млечни крави. Структурата на испитуваната популација крави, зависно од лактацијата во која се наоѓаат по сезони на телење во годините на истражување, е прикажана во Табела 3 и сликовито во Графикон 1.

Табела 3. Структура на испитуваната популација млечни крави

Сезона**	Лактација					Вкупно
	1	2	3	4	5 ≥ *	
112	7	7	2	2	6	24
212	3	6	6	4	7	26
312		2	2	5	9	18
412		7	6	5	4	22
2012	10	22	16	16	26	90
113	16	11	4	2	2	35
213	5	5	4	3	3	20
313	7	9	9	6	8	39
413	5	6	6	6	4	27
2013	33	31	23	17	17	121
Вкупно	43	53	39	33	43	211

* крави во петта и поголема лактација

**кратениците за сезоните на телење и годините се дадени во прилогот Употребени симболи во текстот



Графикон 1. Графички приказ на структурата на испитуваната популација крави

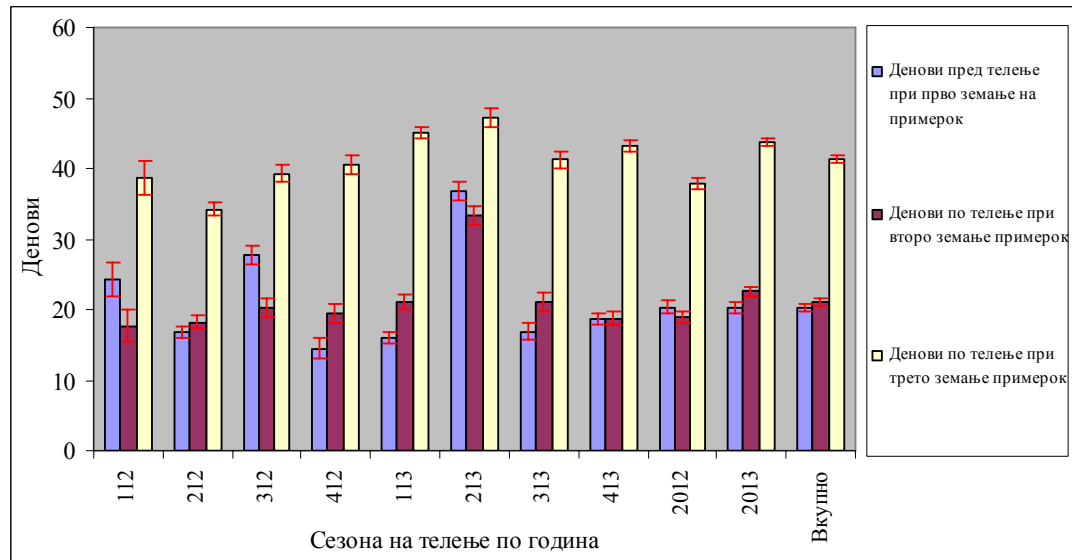
Во Табела 4 и Графикон 2 се прикажани просечниот број на денови по периодите на земање биолошки материјал, крв и млеко, по сезони во годините на телење.

Табела 4. Просечен термин на земање биолошки материјал по периоди, сезони на телење и години

Период		Сезона										Вкупно
		112	212	312	412	2012	113	213	313	413	2013	
-21	\bar{x}	24,29	16,77	27,72	14,53	20,30	15,97	36,68	16,90	18,73	20,18	20,23
	M	29,00	18,00	28,50	12,00	19,50	14,00	37,00	17,00	18,00	17,00	18,00
	$S_{\bar{x}}$	2,313	0,838	1,275	1,373	0,917	0,818	1,333	1,127	0,848	0,840	0,620
21	\bar{x}	17,71	18,23	20,28	19,47	18,88	21,09	33,32	21,15	18,77	22,55	21,08
	M	13,00	17,00	19,50	22,00	18,00	23,00	33,00	21,00	17,50	23,00	21,00
	$S_{\bar{x}}$	2,313	0,838	1,275	1,373	0,734	0,958	1,333	1,298	1,029	0,733	0,539
42	\bar{x}	38,71	34,23	39,28	40,47	37,80	45,00	47,32	41,28	43,27	43,77	41,37
	M	34,00	33,00	38,50	43,00	36,00	46,00	47,00	41,00	43,50	45,00	42,00
	$S_{\bar{x}}$	2,313	0,838	1,275	1,373	0,775	0,796	1,333	1,225	0,812	0,568	0,503

За целиот период на истражување, независно од сезоната на телење, просечниот термин пред телење на земањето на примероци крв, изнесуваше $20,23 \pm 0,620$ денови, додека просечниот термин во периодот по телење, кога се земани примероци крв и млеко изнесуваше $21,08 \pm 0,539$ денови. Последните проби

од крв и млеко од кравите вклучени во истражувањето, беа земено просечно на $41,37 \pm 0,503$ денови во лактацијата.



Графикон 2. Просечен термин на земање биолошки материјал по периоди, сезони на телење и години

5.2. ПРЕВАЛЕНЦИЈА НА ЗДРАВСТВЕНИТЕ НАРУШУВАЊА НА МЛЕЧНАТА ЖЛЕЗДА

Преваленцијата на здравствените нарушувања на млечната жлезда во испитуваната популација опитни крави зависно од сезоната во годината на телење е прикажана во Табела 5.

Табела 5. Преваленција на здравствените нарушувања на млечната жлезда по сезона на телење и година

Година	Сезона	Вкупно	КМТ(-)		КМТ(+)		НС		ИМИ	
		n	n	%	n	%	n	%	n	%
2012	112	24	18	75,00	6	25,00	4	16,67	2	8,33
	212	26	13	50,00	13	50,00	7	26,92	6	23,08
	312	18	9	50,00	9	50,00	6	33,33	3	16,67
	412	22	10	45,45	12	54,55	8	36,36	4	18,18
	Вкупно	90	50	55,56	40	44,44	25	27,78	15	16,67
2013	113	35	16	45,71	19	54,29	11	31,43	8	22,86
	213	20	13	65,00	7	35,00	4	20,00	3	15,00
	313	39	24	61,54	15	38,46	6	15,38	9	23,08
	413	27	17	62,96	10	37,04	4	14,81	6	22,22
	Вкупно	121	70	57,85	51	42,15	25	20,66	26	21,49
Вкупно		211	120	56,87	91	43,13	50	23,70	41	19,43

КМТ(-)=крави кои покажале негативна реакција на калифорнија маститис тестот

КМТ(+)=крави кои покажале позитивна реакција на калифорнија маститис тестот

НС= крави со нарушена секреција на млечната жлезда

ИМИ=крави со интрамамарна инфекција

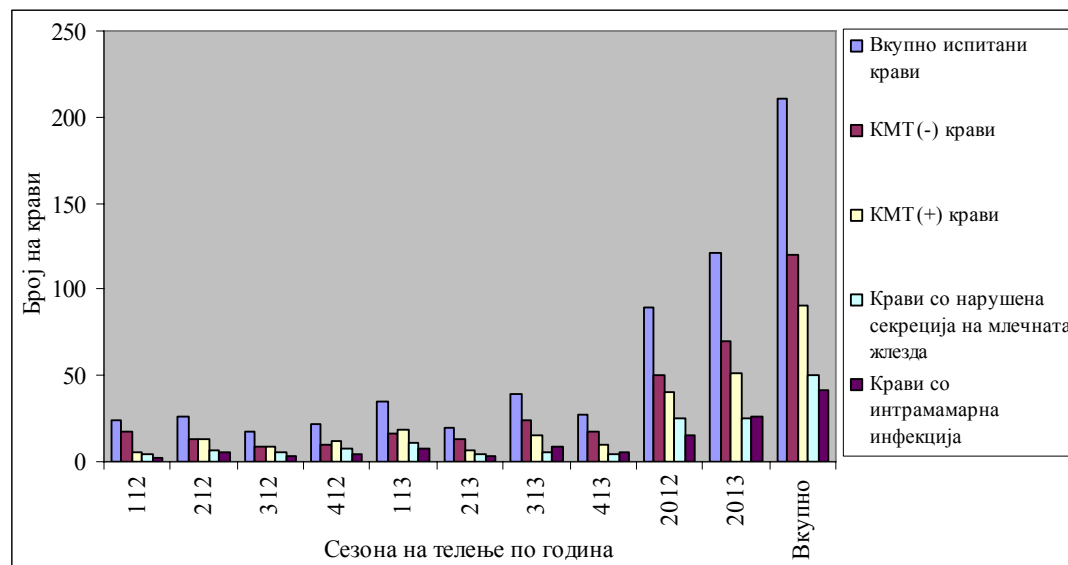
Во испитуваната популација опитни крави, преваленцијата на здравствените нарушувања во текот на првата година од испитувањето изнесуваше 44,44%. При тоа, преваленцијата на нарушената секреција на млечната жлезда изнесуваше 27,78%, а на интрамамарните инфекции 16,67%.

Преваленцијата на здравствените нарушувања на млечната жлезда во втората година на истражувањето покажа слична вредност во однос на првата година (42,15%), со речиси изедначени преваленции на нарушената секреција на млечната жлезда (20,66%) и на интрамамарните инфекции (21,49%) во рамки на таа опитна година.

Највисока преваленција на нарушена секреција на млечната жлезда (36,36%) беше евидентирана во првата година на истражување, во сезоната зима, а најниска (14,81%) во втората година, исто така во сезоната зима. Највисока преваленција на

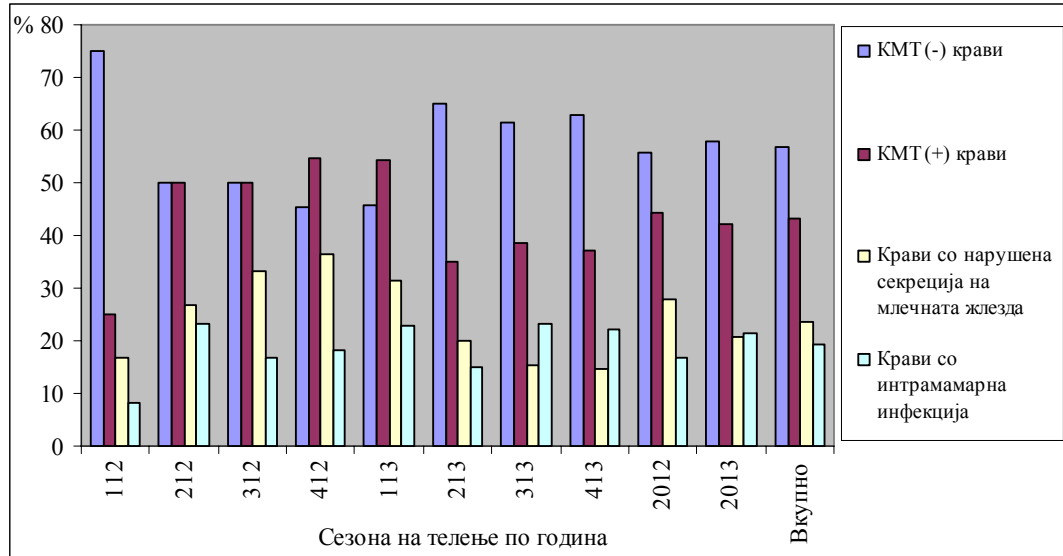
интрамамарните инфекции (23,08%) беше евидентирана во првата година на истражување, во сезоната лето, како и во втората година на истражување во сезоната есен (23,08%), а најниска во сезоната пролет, во првата година на истражување (8,33%). Преваленцијата на нарушената секреција на млечната жлезда за целиот период на истражување изнесуваше 23,70%, а на интрамамарните инфекции 19,43%, или вкупно, преваленцијата на здравствените нарушувања изнесуваше 43,13%.

Дистрибуцијата на испитуваната популација млечни крави во однос на здравствениот статус на млечната жлезда, зависно од сезоната во годината на телење, сликовито е прикажана во Графикон 3.



Графикон 3. Дистрибуција на испитуваната популација крави во однос на здравствениот статус на млечната жлезда по сезона на телење и година

Преваленцијата, односно процентуалниот сооднос на кравите без здравствени нарушувања на млечната жлезда, односно КМТ(-) крави, и на кравите со здравствени нарушувања на млечната жлезда, односно КМТ(+) крави, во вкупната популација испитувани крави во сезоните, сликовито е прикажана во Графикон 4.



Графикон 4. Преваленција на здравствените нарушувања на млечната жлезда по сезона на телење и година

Во Табела 6 прикажан е бројот на крави со микробиолошки потврдена интрамамарна инфекција во однос на вкупниот број на KMT(+) крави, независно од бројот на позитивни четвртинки на млечната жлезда, по сезона на телење во двете години на истражување.

Табела 6. Преваленција на интрамамарните инфекции во однос на KMT(+) крави по сезона на телење и година

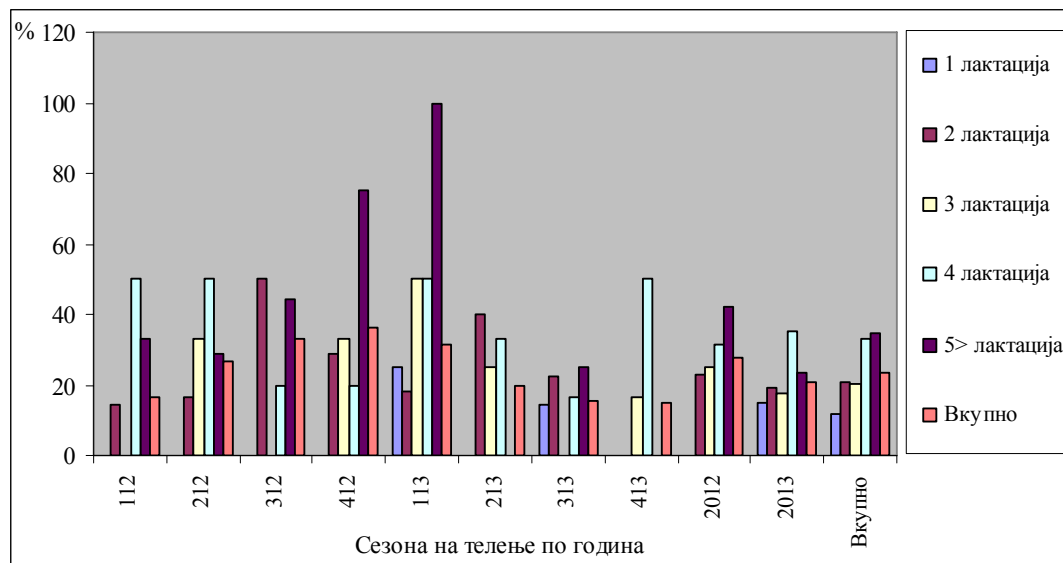
Година	Сезона	KMT(+)	ИМИ	Преваленција
		(n)		%
2012	112	6	2	33,33
	212	13	6	46,15
	312	9	3	33,33
	412	12	4	33,33
	Вкупно	40	15	37,50
2013	113	19	8	42,11
	213	7	3	42,86
	313	15	9	60,00
	413	10	6	60,00
	Вкупно	51	26	50,98
Вкупно		91	41	45,05

Во првата година на истражување, кај 37,50% од КМТ(+) крави, микробиолошки беше утврдено постоење на интрамамарна инфекција. Во сите случаи беше изолиран одреден патоген причинител на мастит. Во втората година на истражување кај половина од КМТ(+) крави (50,98%), микробиолошки беше утврдено присуство на интрамамарна инфекција.

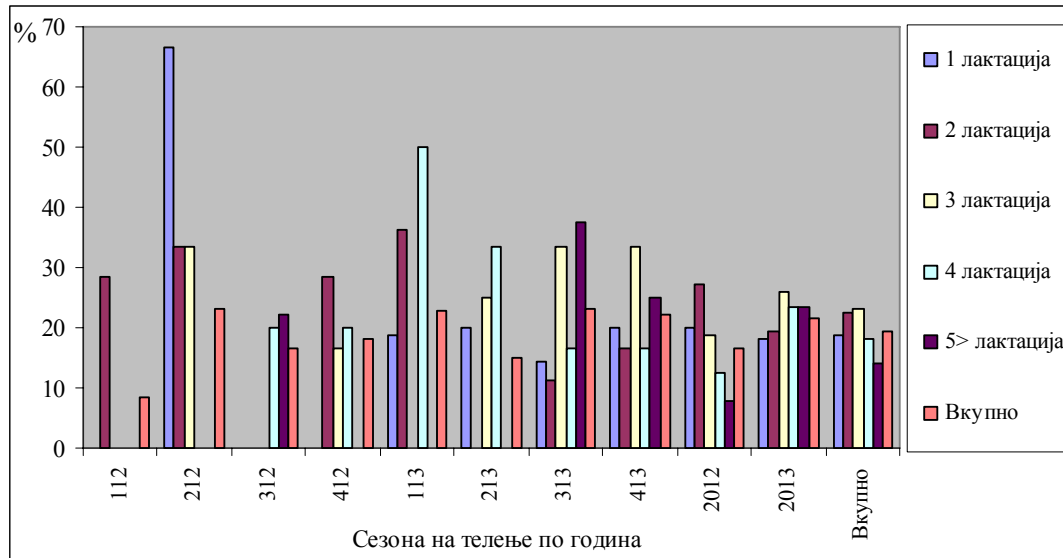
За целиот двегодишен период на истражување, кај 45,05% од КМТ(+) крави микробиолошки беше утврдено присуство на интрамамарна инфекција.

Највисока преваленција на интрамамарни инфекции од КМТ(+) крави беше евидентирана во втората година на истражување, во сезоните есен и зима (60,00%), додека двојно пониска преваленција беше утврдена кај кравите отелени во првата година на истражување, во сезоните пролет, есен и зима (33,33%).

Преваленцијата на нарушената секреција на млечната жлезда и во однос на вкупната популација испитувани крави, зависно од лактацијата по ред на кравите и сезоните на телење, сликовито е прикажана во Графикон 5, а на интрамамарните инфекции во Графикон 6.



Графикон 5. Преваленција на нарушената секреција на млечната жлезда во однос на вкупниот број на испитувани крави, зависно од бројот на лактацијата, сезоната на телење и годината



Графикон 6. Преваленција на интрамамарните инфекции во однос на вкупниот број на испитувани крави, зависно од бројот на лактацијата, сезоната на телење и годината

Преваленцијата на здравствените нарушувања на млечната жлезда, во првата година на истражување, зависно од периодот во лактација и сезоната на телење е прикажана во Табела 7.

Табела 7. Преваленција на здравствените нарушувања на млечната жлезда во првата година на истражување, зависно од периодот во лактација и сезоната на телење

С_П	Вкупно	КМТ(-)		КМТ(+)		НС		ИМИ	
	n	n	%	n	%	n	%	n	%
112_21	24	19	79,17	5	20,83	3	12,50	2	8,33
212_21	26	22	84,62	4	15,38	1	3,85	3	11,54
312_21	18	10	55,56	8	44,44	6	33,33	2	11,11
412_21	22	12	54,55	10	45,45	7	31,82	3	13,64
Вкупно_21	90	63	70,00	27	30,00	17	18,89	10	11,11
112_42	24	22	91,67	2	8,33	1	4,17	1	4,17
212_42	26	16	61,54	10	38,46	7	26,92	3	11,54
312_42	18	13	72,22	5	27,78	4	22,22	1	5,56
412_42	22	17	77,27	5	22,73	2	9,09	3	13,64
Вкупно_42	90	68	75,56	22	24,45	14	15,56	8	8,89

Во првата календарска година на истражување, независно од сезоните на телење, беше евидентирана повисока преваленција на нарушена секреција на

млечната жлезда (18,89%) и интрамамарни инфекции (11,11%) кај кравите кои беа во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација, во споредба со периодот од 22. ден до 42. ден во лактацијата, кога преваленцијата на нарушената секреција на млечната жлезда изнесуваше 15,56%, а на интрамамарните инфекции 8,89%. Вкупната преваленција на здравствените нарушувања на млечната жлезда во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата изнесуваше 30,00%, а на преваленцијата од 22. ден до 42. ден во лактација, 24,45%.

Во Табела 8 е прикажана преваленцијата на здравствените нарушувања на млечната жлезда во втората година на истражување, зависно од периодите во лактација и сезоната на телење.

Табела 8. Преваленција на здравствените нарушувања на млечната жлезда во втората година на истражување, зависно од периодот во лактација и сезоната на телење

С_П	Вкупно	КМТ(-)		КМТ(+)		НС		ИМИ	
	п	п	%	п	%	п	%	п	%
113_21	35	23	65,71	12	34,29	8	22,86	4	11,43
213_21	20	14	70,00	6	30,00	4	20,00	2	10,00
313_21	39	30	76,92	9	23,08	5	12,82	4	10,26
413_21	27	22	81,48	5	18,52	1	3,70	4	14,81
Вкупно_21	121	89	73,55	32	26,45	18	14,88	14	11,57
113_42	35	22	62,86	13	37,14	8	22,86	5	14,29
213_42	20	16	80,00	4	20,00	1	5,00	3	15,00
313_42	39	27	69,23	12	30,77	3	7,69	9	23,08
413_42	27	20	74,07	7	25,93	4	14,81	3	11,11
Вкупно_42	121	85	70,25	36	29,75	16	13,22	20	16,53

Преваленцијата на нарушената секреција од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација изнесуваше 14,88%, а на интрамамарните инфекции 11,57%. Во периодот меѓу 22. ден и 42. ден во лактација преваленцијата на нарушената секреција имаше нешто пониска вредност (13,22%), а на интрамамарните инфекции повисока вредност (16,53%), во споредба со периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација. Ова е во спротивност со добиените резултати за првата година на истражување. Вкупната преваленција на здравствените нарушувања на млечната жлезда во втората година на истражување во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата изнесуваше 26,45%, а во периодот од 22. ден до 42. ден во лактација преваленцијата изнесуваше 29,75%.

Во Табела 9 збирно е прикажана преваленцијата на нарушената секреција на млечната жлезда и на интрамамарните инфекции за целиот двегодишен период на истражување зависно од периодот во лактација.

Табела 9. Преваленција на здравствените нарушувања на млечната жлезда зависно од периодот во лактација за целиот период на истражување

Период	Вкупно	КМТ(-)		КМТ(+)		НС		ИМИ	
	п	п	%	п	%	п	%	п	%
Вкупно 21	211	152	72,04	59	27,96	35	16,59	24	11,37
Вкупно 42	211	153	72,51	58	27,49	30	14,22	28	13,27

Преваленцијата на нарушената секреција на млечната жлезда за целиот двегодишен период на истражување од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација изнесуваше 16,59%, на интрамамарните инфекции 11,37%, или вкупната преваленција на здравствените нарушувања на млечната жлезда изнесуваше 27,96%. Речиси идентична вредност беше добиена за вкупната преваленција на здравствените нарушувања на млечната жлезда за периодот од 22. ден до 42. ден во лактација која изнесуваше 27,49%. Меѓутоа, преваленцијата на нарушената секреција на млечната жлезда во овој период покажа пониска вредност (14,22%), а на интрамамарните инфекции повисока вредност (13,27%), во однос на почетниот период од лактацијата. Преваленцијата на здравствените нарушувања на млечната жлезда во вкупната популација испитувани крави во сезоните, зависно од периодот во лактација, сликовито е прикажана во Графикон 7.



Графикон 7. Преваленција на здравствените нарушувања на млечната жлезда, зависно од периодот во лактација, сезоната на телење и годината

Во Табела 10 е прикажан бројот на крави со интрамамарна инфекција (ИМИ) во однос на вкупниот број на КМТ(+) крави, независно од бројот на позитивни четвртинки на млечната жлезда, по сезони во календарските години, како и за целиот период на истражување, а зависно од периодот во лактација.

Табела 10. Преваленција на интрамамарните инфекции во однос на КМТ(+) крави, зависно од периодот во лактација, сезоната на телење и годината

С_П	2012 година			2013 година			Вкупно		
	KMT(+)	ИМИ	Преваленција	KMT(+)	ИМИ	Преваленција	KMT(+)	ИМИ	Преваленција
	n	n	%	n	n	%	n	n	%
1_21	5	2	40,00	12	4	33,33	17	6	35,29
2_21	4	3	75,00	6	2	33,33	10	5	50,00
3_21	8	2	25,00	9	4	44,44	17	6	35,29
4_21	10	3	30,00	5	4	80,00	15	7	46,67
Вкупно 21	27	10	37,04	32	14	43,75	59	24	40,68
1_42	2	1	50,00	13	5	38,46	15	6	40,00
2_42	10	3	30,00	4	3	75,00	14	6	42,86
3_42	5	1	20,00	12	9	75,00	17	10	58,82
4_42	5	3	60,00	7	3	42,86	12	6	50,00
Вкупно_42	22	8	36,36	36	20	55,56	58	28	48,28

Највисока преваленција на интрамамарните инфекции во однос на КМТ(+) крави во првата година на истражување, во периодот од почетокот на лактацијата до

21. ден во лактацијата беше утврдена во сезоната лето (75,00%), а најниска во сезоната есен (25,00%). Независно од сезоната, преваленцијата на интрамамарните инфекции во овој период од лактацијата во однос на КМТ(+) крави изнесуваше 37,04%. Во однос на периодот од 22. ден до 42. ден во лактацијата, највисока преваленција беше утврдена во сезоната зима (60,00%), а најниска во сезоната есен (20,00%). Вредноста за преваленцијата на интрамамарните инфекции за овој период, независно од сезоната во календарската година, беше слична како за периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден од лактацијата и изнесуваше 36,36%.

Преваленцијата на интрамамарните инфекции во втората година на истражување, за периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација, беше со највисока вредност во сезоната зима (80,00%), а со најниска во сезоните пролет и лето (33,33%). Независно од сезоната на годината, преваленцијата на интрамамарните инфекции во однос на КМТ(+) крави, во втората година на истражување, во овој период изнесуваше 43,75%. Во однос на периодот од 22. ден до 42. ден во лактацијата, највисока преваленција на интрамамарните инфекции беше утврдена во сезоните лето и есен (75,00%), а најниска во сезоната пролет (38,46%). Независно од сезоната на годината, преваленцијата на интрамамарните инфекции во втората година на истражување во овој период во однос на периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата имаше поголема вредност и изнесуваше 55,56%.

Она што може да се забележи од Табела 10 е дека за целиот двегодишен период на истражување, преваленцијата на интрамамарните инфекции во однос на КМТ(+) крави за периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација беше пониска (40,68%), во споредба со вредноста за периодот од 22. ден до 42. ден во лактацијата (48,28%).

Во Табела 11 е прикажана преваленцијата на здравствените нарушувања на четвртинките на млечната жлезда за првата година на истражување.

Табела 11. Преваленција на здравствените нарушувања на четвртинките на млечната жлезда во првата година на истражување, зависно од периодот во лактација по сезона на телење

С_П	Вкупно	КМТ(-)		КМТ(+)		НС		ИМИ	
	n	n	%	n	%	n	%	n	%
112_21	96	87	90,63	9	9,38	4	4,17	5	5,21
212_21	104	98	94,23	6	5,77	1	0,96	5	4,81
312_21	72	61	84,72	11	15,28	9	12,50	2	2,78
412_21	88	76	86,36	12	13,64	9	10,23	3	3,41
2012_21	360	322	89,44	38	10,56	23	6,39	15	4,17
112_42	96	92	95,83	4	4,17	3	3,13	1	1,04
212_42	104	90	86,54	14	13,46	11	10,58	3	2,88
312_42	72	66	91,67	6	8,33	5	6,94	1	1,39
412_42	88	80	90,91	8	9,09	5	5,68	3	3,41
2012_42	360	328	91,11	32	8,89	24	6,67	8	2,22

Во испитуваната популација опитни крави, преваленцијата на здравствените нарушувања на четвртинките на млечната жлезда во текот на првата година од испитувањето, за периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација изнесуваше 10,56%, а за периодот од 22. ден до 42. ден во лактација изнесуваше 8,89%.

Преваленцијата на нарушената секреција на четвртинките на млечната жлезда кај испитуваните крави во двата периоди во лактацијата имаше слични вредности, односно преваленција од 6,39% за периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација, и 6,67% за периодот од 22. ден до 42. ден во лактација.

Во однос на интрамамарните инфекции, забележлива беше двојно повисоката преваленција на инфекциите на четвртинките на млечната жлезда во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација (4,17%), споредено со периодот од 22. ден до 42. ден во лактација, кога преваленцијата на четвртинките на млечната жлезда со инфекција изнесуваше 2,22%.

Во Табела 12 е прикажана преваленцијата на здравствените нарушувања на четвртинките на млечната жлезда за втората година на истражување.

Табела 12. Преваленција на здравствените нарушувања на четвртинките на млечната жлезда во втората година на истражување, зависно од периодот во лактација по сезона на телење

С_П	Вкупно	КМТ(-)		КМТ(+)		НС		ИМИ	
	n	n	%	n	%	n	%	n	%
113_21	140	126	89,29	14	10,00	9	6,43	5	3,57
213_21	80	73	91,25	7	8,75	5	6,25	2	2,50
313_21	156	143	91,67	13	8,33	7	4,49	6	3,85
413_21	108	101	93,52	7	6,48	1	0,93	6	5,56
2013_21	484	443	91,53	41	8,47	22	4,55	19	3,93
113_42	140	120	85,71	20	14,29	12	8,57	8	5,71
213_42	80	74	92,50	6	7,50	1	1,25	5	6,25
313_42	156	141	90,38	15	9,62	4	2,56	11	7,05
413_42	108	98	90,74	10	9,26	5	4,63	5	4,63
2013_42	484	433	89,46	51	10,54	22	4,55	29	5,99

Вкупната преваленцијата на здравствените нарушувања на четвртинките на млечната жлезда во втората година на истражување, изнесуваше 8,47% за периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација, а 10,54% за периодот од 22. до 42. ден во лактација. При тоа, преваленцијата на нарушената секреција на четвртинките на млечната жлезда за периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација и за периодот од 22. до 42. ден во лактација беше идентична и изнесуваше 4,55%.

Во втората година на истражување, забележлива беше повисоката преваленција на интрамамарните инфекции на четвртинките на млечната жлезда во периодот од 22. до 42. ден во лактација (5,99%), споредено со периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација. Овие резултати беа во спротивност со резултатите добиени за првата година на истражување.

Во Табела 13 е прикажана преваленцијата на здравствените нарушувања на четвртинките на млечната жлезда за целиот двегодишен период на истражување.

Табела 13. Преваленција на здравствените нарушувања на четвртинките на млечната жлезда за двете години на истражување, зависно од периодот во лактација

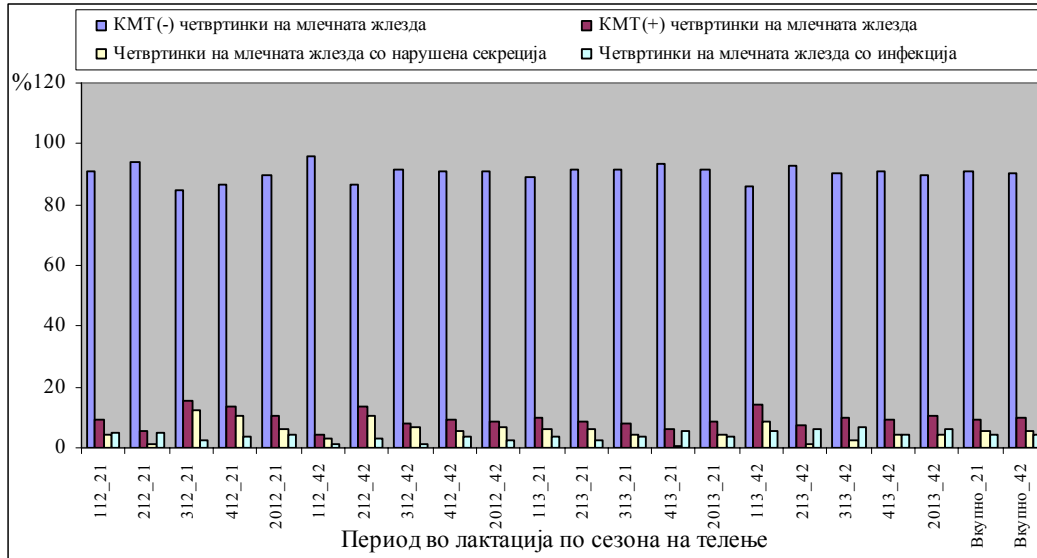
Период	Вкупно	КМТ(-)		КМТ(+)		НС		ИМИ	
	n	n	%	n	%	n	%	n	%
Вкупно 21	844	765	90,64	79	9,36	45	5,33	34	4,03
Вкупно 42	844	761	90,17	83	9,83	46	5,45	37	4,38

Преваленцијата на нарушената секреција на четвртинките на млечната жлезда за целиот двегодишен период на истражување, имаше слични вредности за двата периоди во лактацијата, односно, 5,33% за периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација и 5,45% за периодот од 22. до 42. ден во лактација.

Сличен сооднос постоеше и меѓу вредностите за преваленцијата на интрамамарните инфекции, каде што преваленцијата за периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација изнесуваше 4,03%, а за периодот од 22. до 42. ден во лактација 4,38%.

Исто така, и вкупната преваленција на здравствените нарушувања на ниво на четвртинки на млечната жлезда за целиот период на истражување, покажа ист сооднос за двата периода во лактацијата, односно изнесуваше 9,36% за периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата и 9,83% за периодот од 22. ден до 42. ден во лактација.

Преваленцијата, односно процентуалниот сооднос на кравите без здравствени нарушувања на четвртинките на млечната жлезда и на кравите со здравствени нарушувања на одредени четвртинки на млечната жлезда во вкупната популација испитувани крави во сезоните зависно од периодите во лактација, сликовито е прикажана во Графикон 8.



Графикон 8. Преваленција на здравствените нарушувања на четвртинките на млечната жлезда во испитуваната популација опитни крави, зависно од периодот во лактација, сезоната на телење и годината

Преваленцијата на интрамамарните инфекции на ниво на четвртинки на млечната жлезда во однос на вкупниот број на четвртинки со КМТ(+) реакција, зависно од сезоната на телење и периодот во лактација е прикажана во Табела 14.

Табела 14. Преваленција на интрамамарните инфекции во однос на четвртинките со КМТ(+) реакција, зависно од периодот во лактација, сезоната на телење и годината

С_П	2012 година			2013 година			Вкупно		
	КМТ(+)	ИМИ	Преваленција	КМТ(+)	ИМИ	Преваленција	КМТ(+)	ИМИ	Преваленција
	n	n	%	n	n	%	n	n	%
1 21	9	5	55,56	14	5	35,71	23	10	43,48
2 21	6	5	83,33	7	2	28,57	13	7	53,85
3 21	11	2	18,18	13	6	46,15	24	8	33,33
4 21	12	3	25,00	7	6	85,71	19	9	47,37
Вкупно 21	38	15	39,47	41	19	46,34	79	34	43,04
1 42	4	1	25,00	20	8	40,00	24	9	37,50
2 42	14	3	21,43	6	5	83,33	20	8	40,00
3 42	6	1	16,67	15	11	73,33	21	12	57,14
4 42	8	3	37,50	10	5	50,00	18	8	44,44
Вкупно 42	32	8	25,00	51	29	56,86	83	37	44,58

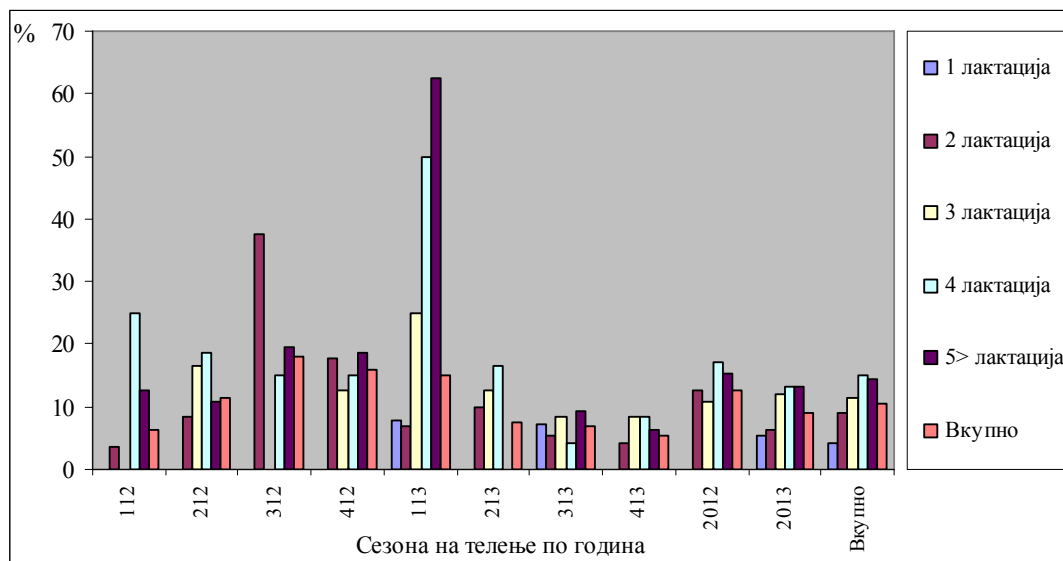
Во првата година на истражување, во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација, 39,47% од четвртинките кои покажале КМТ(+) реакција биле инфицирани и во млекото бил изолиран одреден патоген причинител на мастит. Преваленцијата на инфекцијата на четвртинките на млечната жлезда со КМТ(+) реакција, во периодот од 22. ден до 42. ден во лактација, изнесуваше 25,00%.

Во втората календарска година на истражување, 46,34% од четвртинките со КМТ(+) реакција биле инфицирани во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација и бил изолиран одреден патоген причинител на мастит. Наспроти овој период во лактацијата, во периодот од 22. ден до 42. ден во лактација, преваленцијата беше повисока и изнесуваше 56,86%.

Вкупната преваленцијата на инфекции, за целиот двегодишен период на истражување, покажа незначително пониска вредност за периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација (43,04%), споредено со периодот од 22. ден до 42. ден во лактација (44,58%).

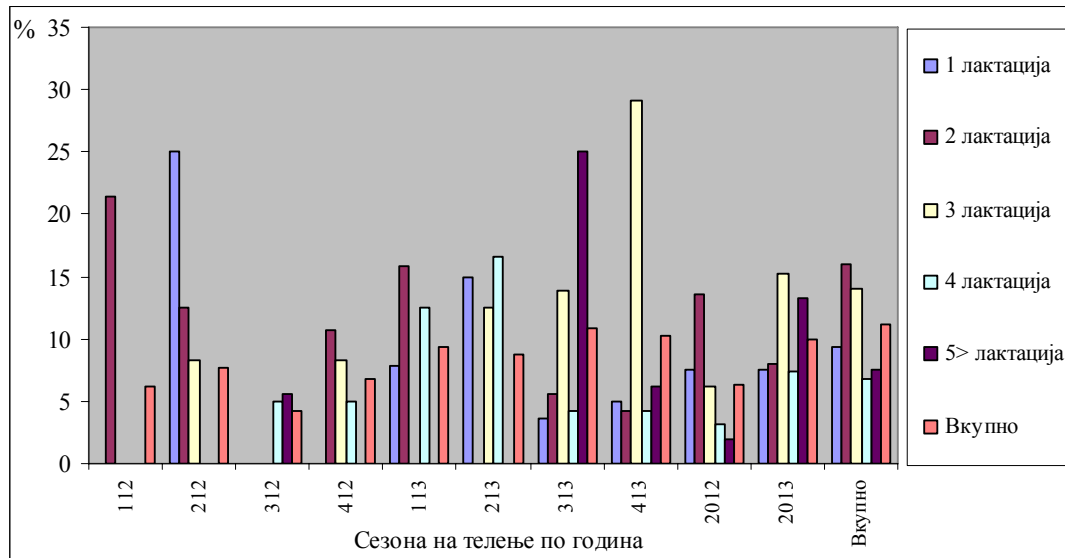
Согласно добиените резултати, пресметаната сензитивност на КМТ, односно предиктивната моќ на тестот за откривање на вистински заболените четвртинки на млечната жлезда со присутна инфекција изнесуваше 43,83% (Табела 15).

Во Графикон 9 сликовито е прикажана дистрибуцијата на нарушената секреција на четвртинките на млечната жлезда, зависно од лактацијата по ред на кравите и сезоната на телење во годината.



Графикон 9. Преваленција на нарушената секреција на четвртинките на млечната жлезда, зависно од бројот на лактацијата, сезоната на телење и годината

Во Графикон 10 сликовито е прикажана дистрибуцијата на инфекции на четвртинките на млечната жлезда, зависно од лактацијата по ред на кравите и сезоната на телење во годината.



Графикон 10. Преваленција на инфекциите на четвртинките на млечната жлезда, зависно од бројот на лактацијата, сезоната на телење и годината

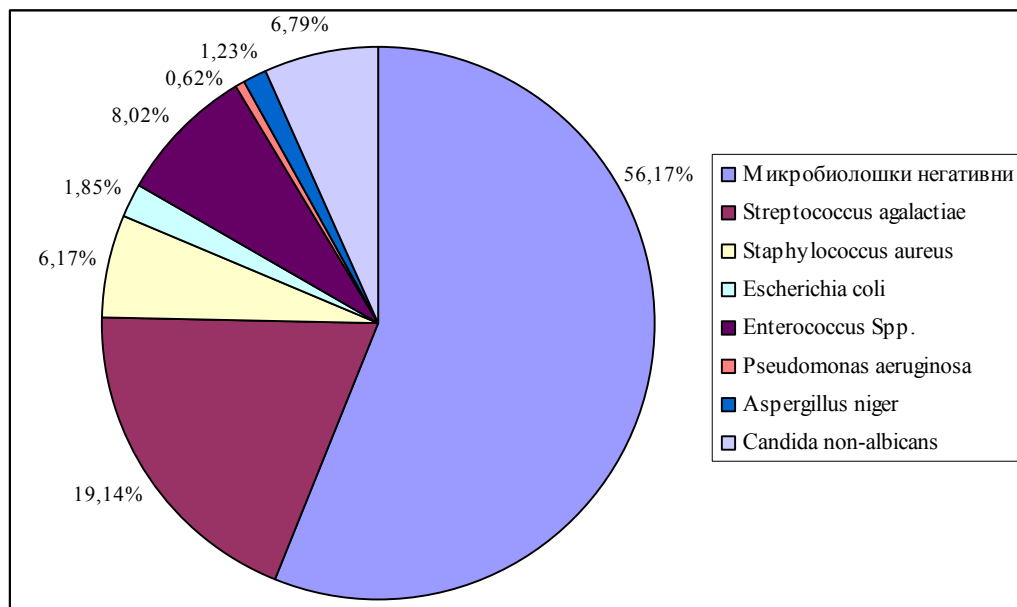
Во Табела 15 е дадена дистрибуцијата на изолираните патогени микроорганизми во примероците од млеко земени од четвртинките на млечната жлезда со КМТ(+) реакција.

Табела 15. Дистрибуција на изолираните патогени микроорганизми од четвртинките на млечната жлезда со КМТ(+) реакција

	n	%		n	%
КМТ(+) четвртинки	162	100,00			
Микробиолошки негативни	91	56,17			
Микробиолошки позитивни	71	43,83	<i>Streptococcus agalactiae</i>	31	19,14
			<i>Enterococcus Spp.</i>	13	8,02
			<i>Candida non-albicans</i>	11	6,79
			<i>Staphylococcus aureus</i>	10	6,17
			<i>Escherichia coli</i>	3	1,85
			<i>Aspergillus niger</i>	2	1,23
			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	0,62

Во текот на целиот двегодишен период на истражување, вкупно беа утврдени 162 четвртинки на млечната жлезда со КМТ(+) реакција. Од нив, 56,17% беа микробиолошки негативни. Во пробите млеко од 19,14% од случаите беше изолиран *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus spp.* во 8,02%, *Candida non-albicans* во 6,79%, *Staphylococcus aureus* во 6,17%, *Escherichia coli* во 1,85%, *Aspergillus niger* во 1,23% и во еден случај беше изолиран *Pseudomonas aeruginosa* (0,62%).

Сликовито, во Графикон 11 е прикажан процентуалниот сооднос на изолираните патогени причинители на мастит од испитаните проби од млеко, земени од четвртинките на млечната жлезда кои покажале КМТ(+) реакција.



Графикон 11. Дистрибуција на изолираните патогени микроорганизми од четвртинките на млечната жлезда со КМТ(+) реакција

Во Табела 16 дадена е дистрибуцијата на изолираните патогени причинители на мастит во пробите млеко од четвртинките на млечната жлезда со инфекција, зависно од сезоните на телење во текот на целиот период на истражување.

Табела 16. Дистрибуција на патогените причинители на мастит, зависно од сезоната на телење и годината на истражување

Година	Сезона	<i>Str. agalactiae</i>		<i>St. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>Enterococcus Spp.</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>A. niger</i>		<i>C. non-albicans</i>	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
2012	112	0	0,00	6	8,45	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	212	7	9,86	0	0,00	1	1,41	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	312	2	2,82	1	1,41	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	412	4	5,63	1	1,41	0	0,00	1	1,41	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	Вкупно	13	18,31	8	11,27	1	1,41	1	1,41	0	0,00	0	0,00	0	0,00
2013	113	9	12,68	1	1,41	0	0,00	1	1,41	0	0,00	2	2,82	0	0,00
	213	2	2,82	0	0,00	0	0,00	5	7,04	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	313	2	2,82	1	1,41	2	2,82	6	8,45	1	1,41	0	0,00	5	7,04
	413	5	7,04	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	6	8,45
	Вкупно	18	25,35	2	2,82	2	2,82	12	16,90	1	1,41	2	2,82	11	15,49
Вкупно	31	43,66	10	14,08	3	4,23	13	18,31	1	1,41	2	2,82	11	15,49	

Од сите примероци од млеко од четвртинките со КМТ(+) реакција, кои беа микробиолошки испитани, 71 беа позитивни. Најголем дел од изолираните микроорганизми беа од видот *Streptococcus agalactiae* (43,66%), потоа од родот *Enterococcus* (18,31%), *Candida non-albicans* (15,49%), *Staphylococcus aureus* (14,08%), *Escherichia coli* (4,23%), *Aspergillus niger* (2,82%) и од еден примерок беше изолиран *Pseudomonas aeruginosa* (1,41%). Генерално, инфекциите на млечната жлезда предизвикани од главните патогени микроорганизми, *Streptococcus agalactiae* и *Staphylococcus aureus*, имаат поголема преваленција кај кравите отелени во сезоните пролет и лето, додека инфекциите предизвикани од патогените микроорганизми од околината, како што се *Escherichia coli* и *Enterococcus spp.*, беа попревалентни во сезоната есен.

Антимикробната осетливост на изолираните причинители на мастит во пробите млеко од четвртинките на млечната жлезда со инфекција е прикажана во Табела 17.

Изолатите на *Streptococcus agalactiae* покажаа осетливост на сите антимикробни средства на кои беа тестирани, со исклучок на *Co-trimoxazol*, кој припаѓа во групата *Trimethoprim+Sulfamethoxazol*.

Изолатите на *Staphylococcus aureus* покажаа резистентност на најголем дел од антимикробните средства на кои беа тестирани, во споредба со останатите изолирани патогени бактерии од случаите на инфекција на млечната жлезда. Тие беа резистентни на *Penicillin*, *Ampicillin*, *Cefuroxim*, *Cefixim*, а делумно осетливи на

Amoxicillin. На останатите антимикробни средства на кои беа тестирани покажаа осетливост.

Изолатите на *Escherichia coli* беа неосетливи на *Amoxicillin*, а делумно осетливи на *Ampicillin*, *Cefalexin* и *Co-trimoxazol*.

Изолатите на *Enterococcus spp.* беа делумно осетливи на *Gentamicin* и *Erythromycin*, додека на останатите антимикробни средства на кои беа тестирани покажаа осетливост.

Изолатот на *Pseudomonas aeruginosa* беше резистентен на *Amoxycylav*, *Cefuroxim*, *Cefixim* и *Co-trimoxazol*, додека на останатите антимикробни средства на кои беше тестиран покажа осетливост.

Табела 17. Антимикробна осетливост на изолираните бактериски причинители на
МАСТИТ

		Str. agalactiae	St. aureus	E. coli	Enterococcus spp.	P. aeruginosa
β-laktam	Penicillin (10 IU)	S	R		S	
	Ampicillin (10 µg)	S	R	I	S	
	Amoxicillin (10 µg)	S	I	R	S	
	Amoxycylav (20/10 µg)	S	S	S	S	R
	Imipenem (10µg)			S		S
	Meropenem (10 µg)			S		S
Glycopeptid	Vancomicin (30 µg)		S		S	
Ureidopenicillin + β-laktam	Piperacilin-tazobactam (100/10 µg)			S		S
Aminoglycosid	Gentamicin (10 µg)			S	I	S
	Amikacin (30µg)		S	S		S
Cephalosporin I	Cefadroxil -ALICEF (30 µg)	S	S	S		
	Cefalexin	S		I		
Cephalosporin III	Cefpodoxime (TRICEF) (10 µg)	S	S			
	Cefuroxim (30µg)		R	S		R
	Ceftriaxon (30µg)	S	S	S		S
	Cefotaxim (30 µg)	S	S	S		S
	Ceftazidim (30µg)			S		S
	Cefixim (Pancef) (5 µg)		R	S		R
Cefalosporini IV	Cefepim (30 µg)			S		S
Linkosamid	Clindamycin (2 µg)	S	S			
Macrolid	Erythromycin (15 µg)	S	S		I	
	Azithromycin (15 µg)	S	S			
	Clarithromycin (5 µg)	S				
Trimethoprim + Sulfamethoxazol	Co-trimoxazol (1,25/23,75 µg)	R	S	I		R
Fluoroquinolon	Ciprofloxacim (5 µg)	S	S	S	S	S
	Moxifloxacim (5µg)	S				
Polymyxin	Colistin (10 µg)			S		S

5.3. ПРОДУКТИВНИ КАРАКТЕРИСТИКИ НА ИСПИТУВАНАТА ПОПУЛАЦИЈА МЛЕЧНИ КРАВИ

Просечната вредност за млечноста на опитните крави во првата година на истражување, зависно од здравствениот статус на млечната жлезда и сезоната на телење е прикажана во Табела 18.

Табела 18. Млечност во првата година на истражување, зависно од здравствениот статус на млечната жлезда и сезоната на телење (kg)

Сезона	Крави	n	ТДМ_1	ТДМ_2	ТДМ_3
			$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$
112	КМТ(-)	18	29,93±2,189	28,77±1,663	28,57±1,268
	КМТ(+)	6	32,99±0,685	29,00±0,408	28,00±0,408
	Вкупно	24	29,79±1,704	28,82±1,266	28,50±1,018
212	КМТ(-)	13	29,13±0,771	27,13±1,134	26,83±1,077
	КМТ(+)	13	30,19±1,322	29,81±1,334	27,42±1,525
	Вкупно	26	29,83±0,804	28,92±0,899	27,22±0,935
312	КМТ(-)	9	21,88±0,648	23,62±0,879	24,42±0,907
	КМТ(+)	9	26,30±1,889	26,18±2,149	22,36±1,228
	Вкупно	18	24,07±1,100	24,90±1,151	23,48±0,756
412	КМТ(-)	10	29,72±0,821	28,63±0,816	26,70±0,155
	КМТ(+)	12	33,06±0,917	31,80±0,801	29,70±0,719
	Вкупно	22	31,24±0,689	30,07±0,645	28,06±0,726
2012	КМТ(-)	50	27,55±0,958	27,35±0,750	26,69±0,588
	КМТ(+)	40	30,16±0,787	29,16±0,767	26,64±0,764
	Вкупно	90	28,77±0,645	28,17±0,541	26,67±0,464

Просечната млечност на КМТ(-) крави, во првата година на истражување, при сите контроли на млеко имаше слични вредности, односно изнесуваше 27,55±0,958 kg при првата контрола на млеко, 27,35±0,750 kg при втората и 26,69±0,588 kg при третата контрола на млеко.

Млечноста на кравите со нарушен здравствен статус на млечната жлезда, односно на КМТ(+) крави, при првата и втората контрола на млеко имаа повисоки вредности во однос на групата КМТ(-) крави, односно во просек изнесуваше 30,16±0,787 kg при првата контрола на млеко, а 29,16±0,767 kg при втората контрола на млеко. Просечната вредност при третата контрола на млеко имаше значајно пониска вредност за млечноста во однос на првата и втората контрола на млеко кај оваа група крави, додека во однос на млечноста при третата контрола на млеко кај

КМТ(-) крави беше речиси идентична ($26,64 \pm 0,764$ kg) во однос на млечноста при третата контрола на млеко кај КМТ(+) крави ($26,69 \pm 0,588$ kg).

Независно од здравствениот статус на млечната жлезда, просечната млечност на опитните крави во првата година на истражување изнесуваше $28,77 \pm 0,645$ kg при првата контрола на млеко, $28,17 \pm 0,541$ kg при втората и $26,67 \pm 0,464$ kg при третата контрола на млеко.

Просечна вредност за млечноста на кравите во втората година на истражување, зависно од здравствениот статус на млечната жлезда и сезоната на телење е прикажана во Табела 19.

Табела 19. Млечност на кравите во втората година на истражување, зависно од здравствениот статус на млечната жлезда и сезоната на телење (kg)

Сезона	Крави	n	ТДМ 1	ТДМ 2	ТДМ 3
			$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$
113	КМТ(-)	16	33,35 \pm 1,639	31,00 \pm 1,337	26,93 \pm 1,944
	КМТ(+)	19	29,67 \pm 1,190	26,89 \pm 1,554	26,09 \pm 1,256
	Вкупно	35	31,99\pm1,050	29,48\pm1,028	26,60\pm1,150
213	КМТ(-)	13	19,37 \pm 1,412	24,84 \pm 1,759	22,43 \pm 2,500
	КМТ(+)	7	23,62 \pm 3,302	25,32 \pm 3,153	24,92 \pm 3,973
	Вкупно	20	21,01\pm1,503	25,02\pm1,528	23,39\pm2,071
313	КМТ(-)	24	25,14 \pm 1,210	29,03 \pm 1,422	29,80 \pm 1,575
	КМТ(+)	15	23,44 \pm 2,096	25,29 \pm 1,720	26,77 \pm 0,860
	Вкупно	39	24,39\pm1,106	27,39\pm1,118	28,46\pm1,001
413	КМТ(-)	17	34,53 \pm 2,509	33,32 \pm 1,871	36,88 \pm 1,413
	КМТ(+)	10	37,06 \pm 2,444	32,33 \pm 3,020	28,15 \pm 1,915
	Вкупно	27	35,47\pm1,806	32,95\pm1,592	33,52\pm1,392
2013	КМТ(-)	70	28,99 \pm 1,117	30,18 \pm 0,861	30,25 \pm 1,057
	КМТ(+)	51	28,46 \pm 1,314	27,56 \pm 1,130	26,77 \pm 0,813
	Вкупно	121	28,78\pm0,847	29,14\pm0,693	28,84\pm0,719

Во втората календарска година, просечната млечност на КМТ(-) крави изнесуваше $28,99 \pm 1,117$ kg при првата контрола на млеко, $30,18 \pm 0,861$ kg при втората и $30,25 \pm 1,057$ kg при третата контрола на млеко.

Просечната млечност на кравите со нарушен здравствен статус на млечната жлезда, односно на КМТ(+) крави, изнесуваше $28,46 \pm 1,314$ kg при првата контрола на млеко, $27,56 \pm 1,130$ kg при втората и $26,77 \pm 0,813$ kg при третата контрола на млеко. Забележливо е континуираното опаѓање на млечноста кај оваа група крави,

почнувајќи од првата кон третата контрола на млеко. Инаку, сите овие вредности беа пониски во однос на групата КМТ(-) крави при истите контроли на млеко.

Независно од здравствениот статус на млечната жлезда, просечната вредност на млечност на кравите во втората година на истражување изнесуваше $28,78 \pm 0,847$ kg при првата контрола на млеко, $29,14 \pm 0,693$ kg при втората и $28,84 \pm 0,719$ kg при третата контрола на млеко.

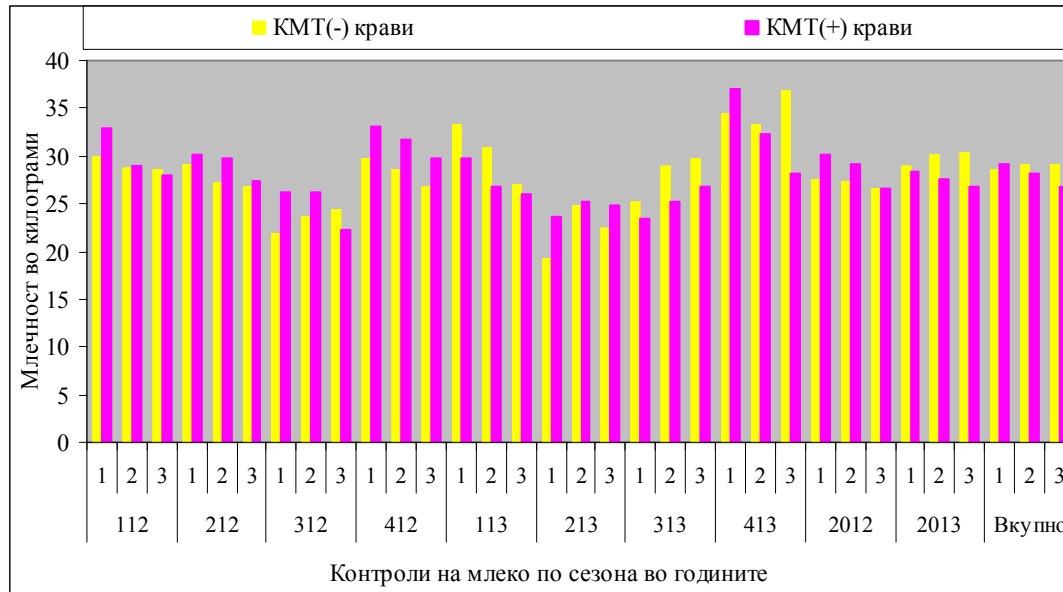
Просечната млечност на кравите за целиот двегодишен период на истражување, зависно од здравствениот статус на млечната жлезда е прикажана во Табела 20.

Табела 20. Млечност на опитните крави за целиот двегодишен период на истражување, зависно од здравствениот статус на млечната жлезда (kg)

Крави	n	ТДМ 1	ТДМ 2	ТДМ 3
		$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$
КМТ(-)	120	$28,52 \pm 0,782$	$29,25 \pm 0,615$	$29,16 \pm 0,718$
КМТ(+)	91	$29,11 \pm 0,838$	$28,17 \pm 0,736$	$26,72 \pm 0,572$
Вкупно	211	$28,76 \pm 0,572$	$28,79 \pm 0,472$	$28,15 \pm 0,485$

Во текот на целиот период на истражување, независно од сезоната на телење, КМТ(-) крави имаа значително изедначени вредности при сите контроли на млеко ($28,52 \pm 0,782$ kg – $29,25 \pm 0,615$ kg). За разлика од оваа група крави, КМТ(+) крави имаа највисока вредност при првата контрола на млеко ($29,11 \pm 0,838$ kg), која беше повисока и од млечноста на КМТ(-) крави при истата контрола на млеко. Меѓутоа, при втората и третата контрола на млеко, млечноста на КМТ(+) крави имаше тренд на континуирано опаѓање во однос на КМТ(-) крави.

Сликовито, резултатите за просечната млечност на кравите за целиот период на истражување се прикажани во Графикон 12.



Графикон 12. Графички приказ за млечноста на опитните крави зависно од здравствениот статус на млечната жлезда, сезоната на телење и годината

Просечната млечност на опитните крави, зависно од здравствениот статус на млечната жлезда и возраста на кравите, е прикажана во Табела 21.

Највисока просечна млечност кај КМТ(-) крави беше утврдена во четвртата лактација при сите контроли на млеко ($30,42 \pm 1,970$ – $34,99 \pm 1,650$ kg), а најниска кај кравите во петта и поголема лактација, и изнесуваше $24,04 \pm 1,246$ kg при првата контрола на млеко, $28,77 \pm 1,115$ kg при втората и $24,22 \pm 1,641$ kg при третата контрола на млеко.

Генерално, КМТ(+) крави, независно од лактацијата по ред, при првата контрола на млеко имаа повисока млечност во споредба со КМТ(-) крави ($29,10 \pm 0,838$ kg), додека при втората ($28,17 \pm 0,736$ kg) и третата контрола на млеко ($26,72 \pm 0,572$ kg) постоеше забележливо намалување на вредностите за просечната млечност.

Табела 21. Млечност на кравите, зависно од здравствениот статус на млечната жлезда и лактацијата по ред на кравите (kg)

Лактација по ред	Крави	n	ТДМ_1	ТДМ_2	ТДМ_3
			$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$
1	КМТ(-)	30	29,35±1,484	28,42±1,219	30,80±1,457
	КМТ(+)	13	25,89±2,158	25,26±1,725	26,28±2,050
	Вкупно	43	28,46±1,231	27,60±1,010	29,57±1,217
2	КМТ(-)	29	29,26±1,561	29,57±1,166	27,25±1,462
	КМТ(+)	24	30,78±1,076	28,78±0,986	27,36±0,643
	Вкупно	53	29,90±0,990	29,24±0,777	27,29±0,901
3	КМТ(-)	22	27,43±1,874	30,06±1,631	28,59±1,049
	КМТ(+)	17	28,92±1,738	28,17±2,109	26,78±1,144
	Вкупно	39	28,20±1,254	29,07±1,294	27,61±0,766
4	КМТ(-)	17	31,77±2,287	30,41±2,252	34,99±1,650
	КМТ(+)	16	28,91±2,857	27,52±2,198	26,79±1,632
	Вкупно	33	30,42±1,970	29,04±1,554	30,89±1,344
5	КМТ(-)	22	24,04±1,246	28,77±1,115	24,22±1,641
	КМТ(+)	21	29,60±2,069	30,03±1,572	26,38±1,324
	Вкупно	43	26,71±1,242	29,37±0,939	25,35±1,038
Вкупно	КМТ(-)	120	28,52±0,782	29,25±0,615	29,17±0,718
	КМТ(+)	91	29,10±0,838	28,17±0,736	26,72±0,572
	Вкупно	211	28,76±0,572	28,79±0,472	28,15±0,485

5.4. КАЛИБРАЦИЈА НА РЕАКЦИИТЕ ЗА ОДРЕДУВАЊЕ НА АКТИВНОСТА НА ЕНЗИМИТЕ НА ОКСИДАТИВЕН СТРЕС

5.4.1. КАЛИБРАЦИЈА НА РЕАКЦИИТЕ ЗА ОДРЕДУВАЊЕ НА СУПЕРОКСИД ДИСМУТАЗАТА (SOD)

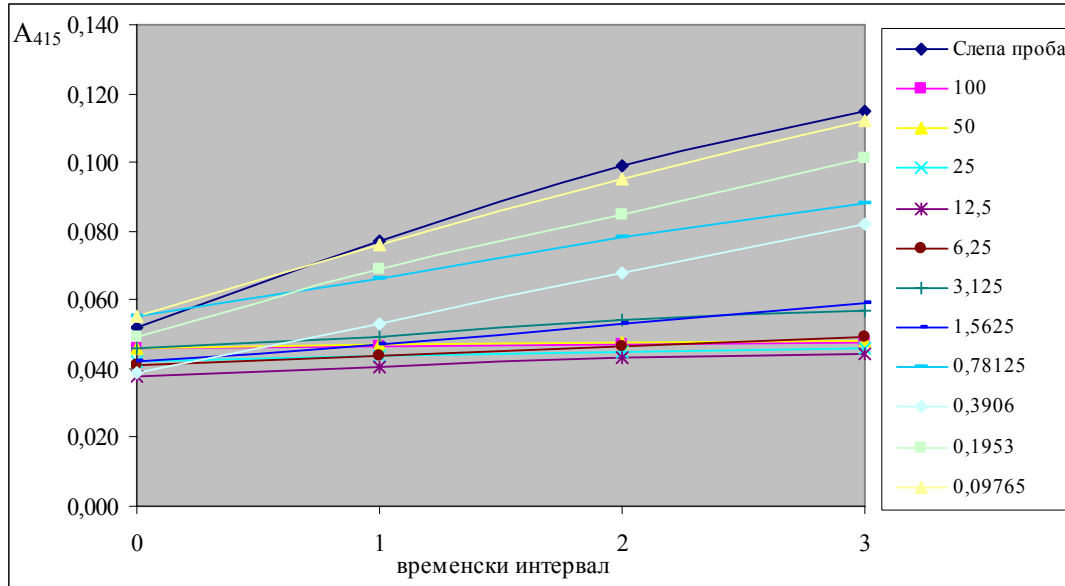
Одредувањето на активноста на ензимот супероксид димутаза (SOD) во реактивната мешавина е направено врз основа на стандардна крива во која беа користени познати концентрации од стандардот на Cu/Zn-SOD добиен од говедски еритроцити.

Во Табела 22 се прикажани добиените резултати од направената контролна калибрациска реакција на SOD.

Табела 22. Контролна калибрациска реакција на SOD

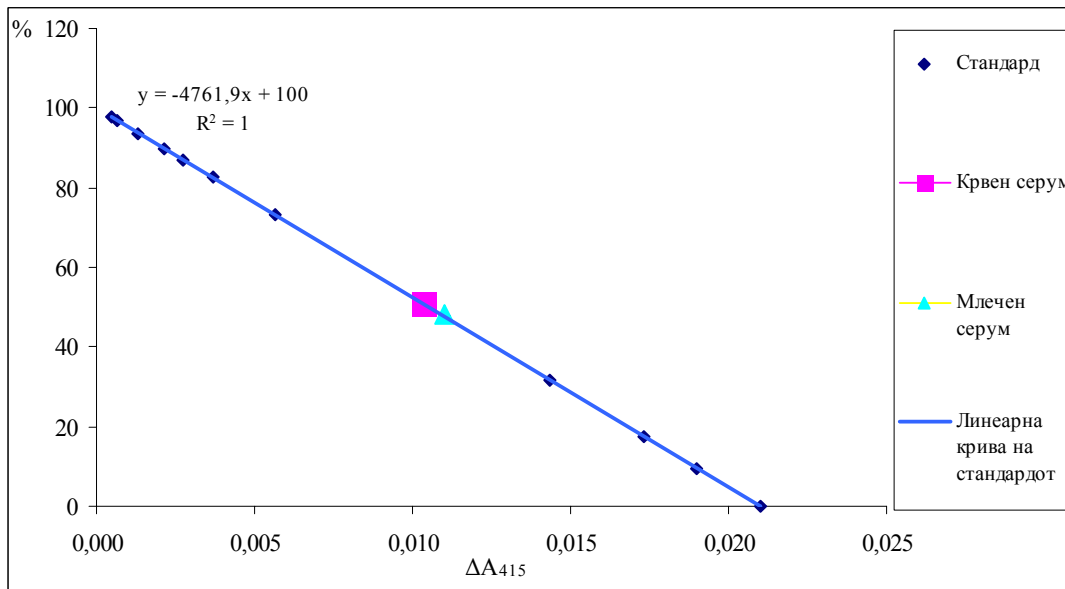
	A0	A1	A2	A3	A0-A1	A1-A2	A2-A3	ΔA415	Pearson	I (%)
Слепа проба	0,079	0,121	0,156	0,181	0,042	0,035	0,025	0,034	0,9877	0,0000
100 U/ml	0,052	0,053	0,054	0,055	0,001	0,001	0,001	0,001	1,0000	97,0588
50 U/ml	0,051	0,052	0,053	0,055	0,001	0,001	0,002	0,001	0,9657	96,0784
25 U/ml	0,053	0,054	0,056	0,058	0,001	0,002	0,002	0,002	0,9797	95,0980
12,5 U/ml	0,050	0,053	0,053	0,057	0,003	0,000	0,004	0,002	0,8909	93,1373
6,25 U/ml	0,053	0,057	0,060	0,065	0,004	0,003	0,005	0,004	0,9909	88,2353
3,125 U/ml	0,048	0,057	0,066	0,074	0,009	0,009	0,008	0,009	0,9992	74,5098
1,5625 U/ml	0,052	0,070	0,089	0,105	0,018	0,019	0,016	0,018	0,9989	48,0392
0,78125 U/ml	0,048	0,075	0,101	0,123	0,027	0,026	0,022	0,025	0,9979	26,4706
0,3906 U/ml	0,053	0,085	0,115	0,136	0,032	0,030	0,021	0,028	0,9917	18,6275
0,1953 U/ml	0,067	0,100	0,130	0,153	0,033	0,030	0,023	0,029	0,9938	15,6863
0,09765 U/ml	0,052	0,089	0,121	0,145	0,037	0,032	0,024	0,031	0,9912	8,8235

Растот на апсорбанцата во единица време е право пропорционален со активноста на SOD. Пропорционално, со намалување на концентрацијата на SOD во реактивната мешавина, се намалува процентот на инхибиција на автооксидацијата на пирогалолот. Притоа, растот на апсорбанцата во минута, мерена на 415 nm (A_{415}), покажа приближно идеална линеарност, која сликовито е прикажана во Графикон 13. Всушност, линеарноста во растот на апсорбанцата е услов за реално одредување на активноста на SOD во реактивната мешавина, овозможувајќи спектрофотометриска визуелизација на истата.



Графикон 13. Линераност на контролната калибрациска реакција за одредување на активноста на SOD ($\mu\text{U/ml}$)

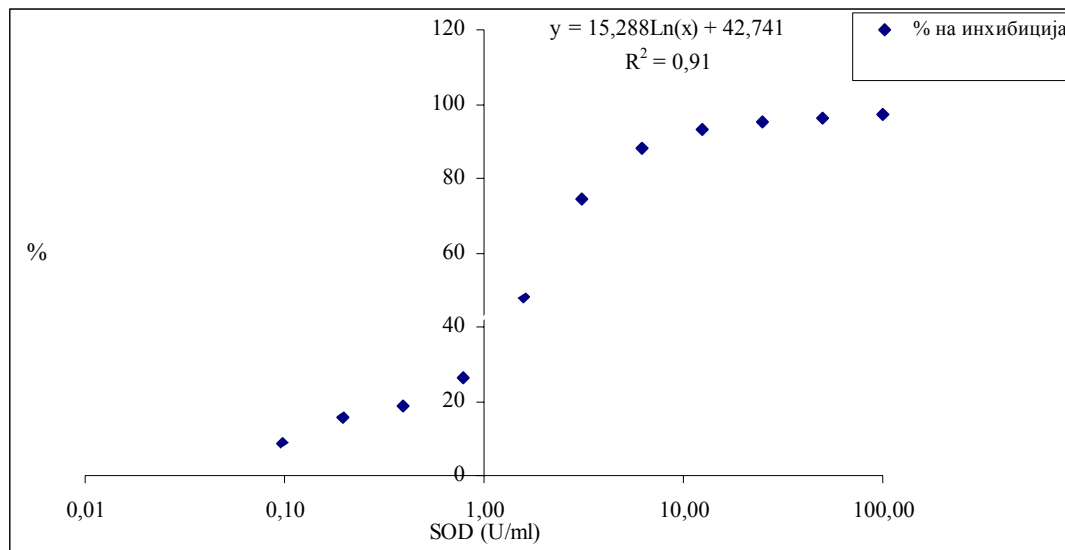
Во Графиконот 14 се прикажани вредностите за промената на апсорбанцата во минута на стандардната крива, пробата крвен и млечен серум во зависност од активноста на SOD.



Графикон 14. Промена на апсорбанцата во единица време на стандардот, крвниот и млечниот серум во зависност од активноста на SOD

Промените на апсорбанците во крвниот и млечниот серум се наоѓаат приближно на средината на линерната крива која е добиена со внесување на вредностите за промените на апсорбанците на стандардот со познати концентрации на Cu/Zn-SOD. Ова гарантира дека реакцијата овозможува реално мерење на активноста на SOD во примерокот крвен и млечен серум.

Во Графиконот 15 е прикажана логаритамската функција добиена од процентот на инхибицијата на автооксидацијата на пирогалолот на стандардот кога се користени познати концентрации на Cu/Zn-SOD. Врз основа на таа логаритамска функција пресметана е активноста на SOD во испитуваните примероци крвен и млечен серум добиени од опитните крави.



Графикон 15. Логаритамска функција за пресметување на активноста на SOD во крвниот и млечниот серум

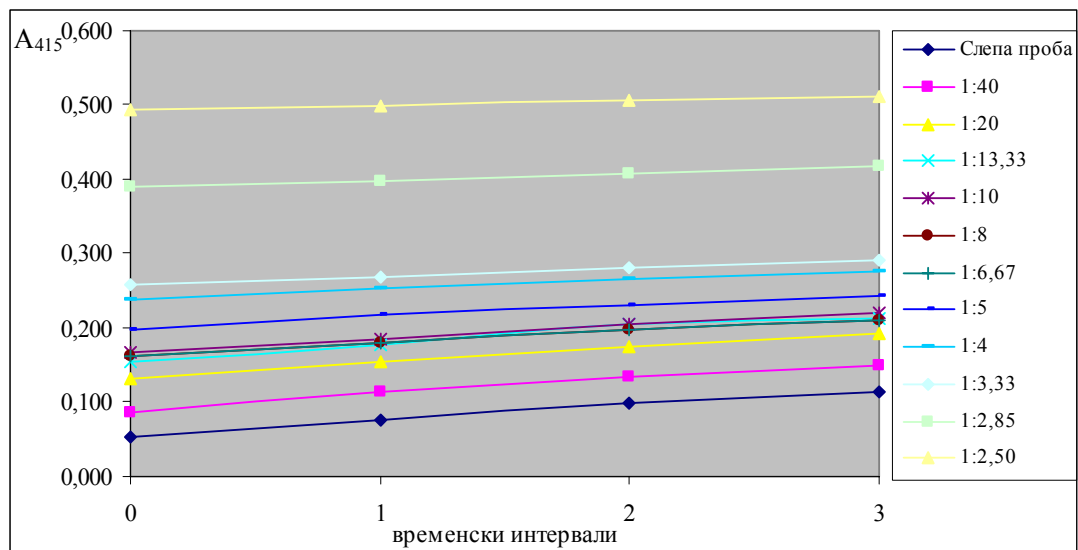
Во Табела 23 се прикажани добиените вредности за апсорбанците кои се користеа за одредување на активноста на SOD во крвниот серум.

Табела 23. Калибрација на реакцијата за одредување на SOD во крвниот серум на кравите

Разредување	A0	A1	A2	A3	A0-A1	A1-A2	A2-A3	ΔA415	Pearson	I (%)
Слепа проба	0,052	0,077	0,099	0,115	0,025	0,022	0,016	0,021	0,9908	0,0000
1:40	0,087	0,114	0,134	0,150	0,027	0,020	0,016	0,021	0,9861	0,0000
1:20	0,131	0,155	0,175	0,193	0,024	0,020	0,018	0,021	0,9957	1,5873
1:13,33	0,155	0,176	0,205	0,212	0,021	0,029	0,007	0,019	0,9551	9,5238
1:10	0,168	0,184	0,204	0,220	0,016	0,020	0,016	0,017	0,9979	17,4603
1:8	0,162	0,181	0,197	0,211	0,019	0,016	0,014	0,016	0,9953	22,2222
1:6,67	0,161	0,181	0,197	0,211	0,020	0,016	0,014	0,017	0,9934	20,6349
1:5	0,197	0,217	0,231	0,242	0,020	0,014	0,011	0,015	0,9817	28,5714
1:4	0,237	0,253	0,265	0,275	0,016	0,012	0,010	0,013	0,9885	39,6825
1:3,33	0,259	0,269	0,281	0,290	0,010	0,012	0,009	0,010	0,9973	50,7937
1:2,85	0,390	0,397	0,407	0,418	0,007	0,010	0,011	0,009	0,9906	55,5556
1:2,50	0,493	0,499	0,506	0,511	0,006	0,007	0,005	0,006	0,9963	71,4286

За постигнување добра линеарност во растот на апсорбанцата во минута како резултат на автооксидацијата на пирогалолот беа користени различни разредувања на примероците крвен серум.

Во Графиконот 16 се прикажани калибрационите криви за одредување на активноста на SOD во крвниот серум.



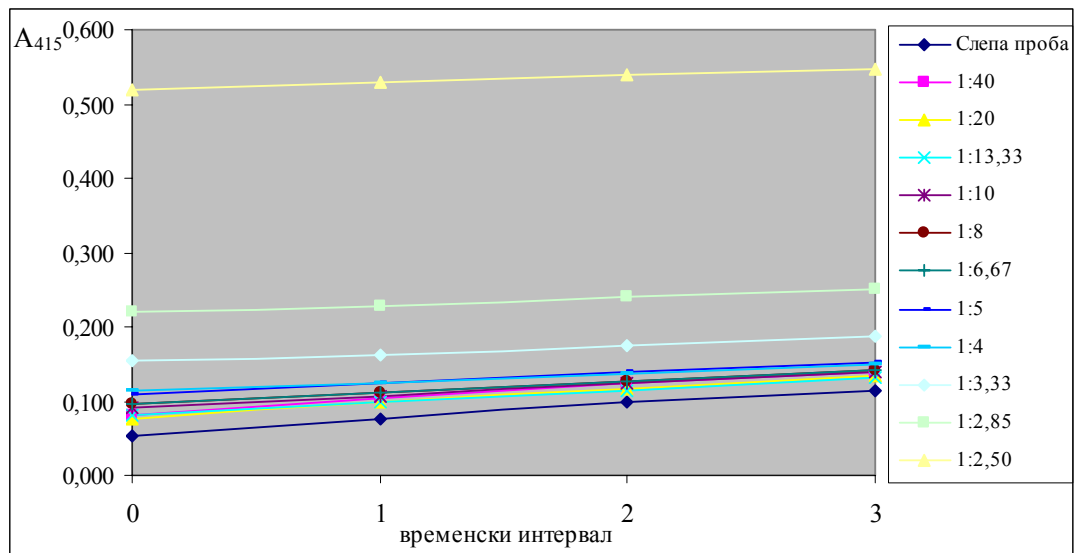
Графикон 16. Калибрациски криви за одредување на активноста на SOD во крвниот серум

Во Табела 24 се прикажани добиените вредности за апсорбанците кои се користеа за одредување на активноста на SOD во млечниот серум. И во овој случај, заради постигнување добра линеарност во растот на апсорбанцата во минута како резултат на автооксидацијата на пирогалолот беа користени различни разредувања на примероците млечен серум.

Табела 24. Калибрација на реакцијата за одредување на активноста на SOD во млечниот серум на кравите

Разредување	A0	A1	A2	A3	A0-A1	A1-A2	A2-A3	ΔA415	Pearson	I (%)
Слепа проба	0,052	0,077	0,099	0,115	0,025	0,022	0,016	0,021	0,9908	0,0000
1:40	0,081	0,104	0,123	0,139	0,023	0,019	0,016	0,019	0,9934	7,9365
1:20	0,077	0,098	0,117	0,134	0,021	0,019	0,017	0,019	0,9978	9,5238
1:13,33	0,080	0,098	0,114	0,131	0,018	0,016	0,017	0,017	0,9995	19,0476
1:10	0,091	0,107	0,124	0,140	0,016	0,017	0,016	0,016	0,9999	22,2222
1:8	0,096	0,112	0,127	0,143	0,016	0,015	0,016	0,016	0,9998	25,3968
1:6,67	0,097	0,111	0,127	0,143	0,014	0,016	0,016	0,015	0,9990	26,9841
1:5	0,110	0,123	0,139	0,153	0,013	0,016	0,014	0,014	0,9986	31,7460
1:4	0,115	0,125	0,137	0,150	0,010	0,012	0,013	0,012	0,9967	44,4444
1:3,33	0,155	0,163	0,175	0,187	0,009	0,012	0,012	0,011	0,9939	48,4127
1:2,85	0,219	0,229	0,240	0,251	0,010	0,011	0,011	0,011	0,9995	49,2063
1:2,50	0,520	0,529	0,540	0,547	0,009	0,011	0,007	0,009	0,9934	57,1429

Во Графиконот 17 се прикажани калибрациските криви за одредување на активноста на SOD во млечниот серум.



Графикон 17. Калибрациски криви за одредување на активноста на SOD во млечниот серум

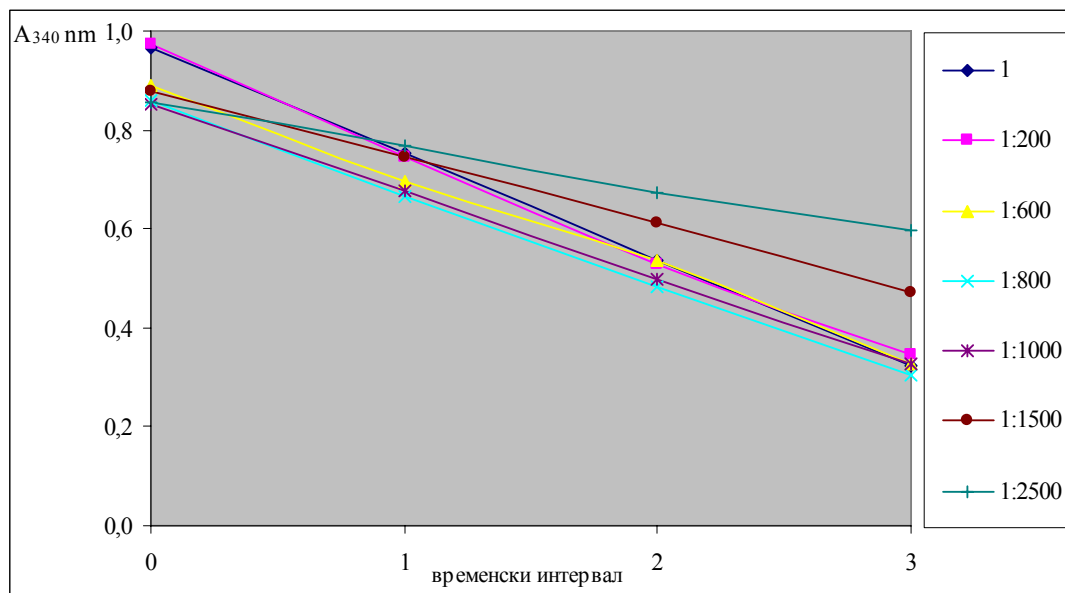
5.4.2. КАЛИБРАЦИЈА НА РЕАКЦИИТЕ ЗА ОДРЕДУВАЊЕ НА ГЛУТАТИОН ПЕРОКСИДАЗАТА (GPx)

Во Табела 25 се прикажани добиените вредности за промената на апсорбанците во единица време на реактивната мешавина за одредување на активноста на глутатион пероксидазата (GPx) во крвниот серум.

Табела 25. Калибрација на реакцијата за одредување на активноста на GPx во крвниот серум

Разредување	A0	A1	A2	A3	A0-A1	A1-A2	A2-A3	ΔA_{340}	Pearson
1	0,965	0,754	0,537	0,324	0,211	0,217	0,213	0,214	1,0000
1:200	0,974	0,745	0,527	0,345	0,229	0,218	0,182	0,210	0,9974
1:600	0,888	0,695	0,535	0,328	0,193	0,160	0,207	0,187	0,9978
1:800	0,858	0,666	0,483	0,304	0,192	0,183	0,179	0,185	0,9997
1:1000	0,853	0,676	0,500	0,326	0,177	0,176	0,174	0,176	1,0000
1:1500	0,877	0,747	0,614	0,473	0,130	0,133	0,141	0,135	0,9997
1:2500	0,855	0,769	0,673	0,596	0,086	0,096	0,077	0,086	0,9984

Во Графиконот 18 се прикажани калибрациските криви за одредување на активноста на GPx во крвниот серум.



Графикон 18. Калибрациски криви за одредување на активноста на GPx во крвниот серум

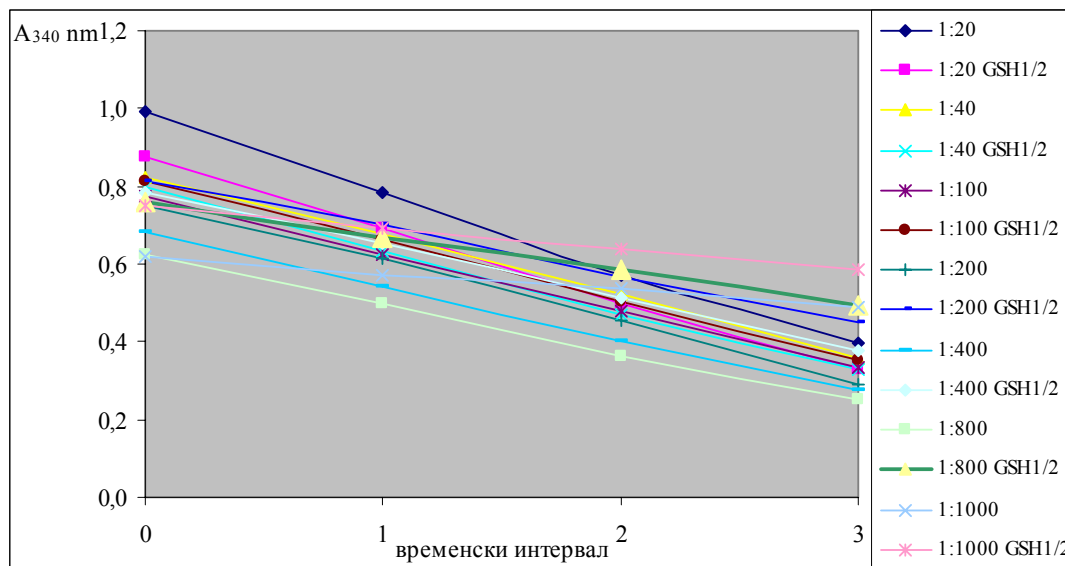
Основен услов кој треба да се исполни за добра калибрација на реакцијата е линеарноста во опаѓањето на апсорбанцата во минута. За задоволување на тој критериум беа користени различни сериски разредувања на крвниот серум во финалната реактивна мешавина.

Во Табела 26 се прикажани вредностите за промената на апсорбанците во единица време на реактивните мешавини за одредување на активноста на глутатион пероксидазата во млечниот серум. Притоа, за постигнување добра линеарност во намалувањето на апсорбанцата, беа користени различни разредувања на млечниот серум и различни концентрации на редуциран глутатион во реактивната мешавина.

Табела 26. Калибрација на реакцијата за одредување на активноста на GPx во млечниот серум

Разредување	A0	A1	A2	A3	A0-A1	A1-A2	A2-A3	ΔA_{340}	Pearson
1:20	0,994	0,783	0,569	0,396	0,211	0,214	0,173	0,199	0,9977
1:20 GSH_{1/2}	0,874	0,691	0,500	0,331	0,183	0,191	0,169	0,181	0,9994
1:40	0,824	0,679	0,523	0,359	0,145	0,156	0,164	0,155	0,9992
1:40 GSH_{1/2}	0,796	0,632	0,468	0,328	0,164	0,164	0,140	0,156	0,9986
1:100	0,772	0,625	0,479	0,333	0,147	0,146	0,146	0,146	1,0000
1:100 GSH_{1/2}	0,815	0,661	0,502	0,353	0,154	0,159	0,149	0,154	0,9999
1:200	0,748	0,615	0,453	0,289	0,133	0,162	0,164	0,153	0,9977
1:200 GSH_{1/2}	0,812	0,700	0,566	0,448	0,112	0,134	0,118	0,121	0,9989
1:400	0,682	0,540	0,401	0,278	0,142	0,139	0,123	0,135	0,9989
1:400 GSH_{1/2}	0,782	0,652	0,512	0,379	0,130	0,140	0,133	0,134	0,9998
1:800	0,624	0,496	0,363	0,251	0,128	0,133	0,112	0,124	0,9988
1:800 GSH_{1/2}	0,759	0,670	0,584	0,494	0,089	0,086	0,090	0,088	0,9999
1:1000	0,619	0,572	0,538	0,488	0,047	0,034	0,050	0,044	0,9952
1:1000 GSH_{1/2}	0,751	0,691	0,638	0,584	0,060	0,053	0,054	0,056	0,9992

Во Графиконот 19 се прикажани калибрациските криви за одредување на активноста на GPx во млечниот серум.



Графикон 19. Калибрациски криви за одредување на активноста на GPx во млечниот серум

5.5. АКТИВНОСТ НА ЕНЗИМИТЕ НА ОКСИДАТИВЕН СТРЕС

Во текот на истражувањето, беше одредувана специфичната активност на двата најважни антиоксидативни ензима - супероксид дисмутазата и глутатион пероксидазата во крвниот и млечниот серум на опитните крави.

5.5.1. АКТИВНОСТ НА ЕНЗИМИТЕ НА ОКСИДАТИВЕН СТРЕС ВО КРВНИОТ СЕРУМ

Специфичната активност на супероксид дисмутазата и глутатион пероксидазата, во крвниот серум беше одредувана со помош на индиректни спектрофотометриски кинетички методи. Методите беа едноставни за изведување и истовремено специфични и осетливи за одредување на ензимите.

5.5.1.1. АКТИВНОСТ НА СУПЕРОКСИД ДИСМУТАЗАТА (SOD)

Добиените резултати за специфичната активност на ензимот супероксид дисмутаза (SOD) во крвниот серум на испитуваната популација млечни крави, во првата година на истражување, зависно од здравствениот статус на млечната жлезда, сезоната на телење, како и од периодот на земање на пробата, се прикажани во Табела 27.

Најголема активност на SOD во крвниот серум на кравите независно од здравствениот статус на млечната жлезда во сите три периоди на земањето на пробите за испитување, беше регистрирана во сезоната есен ($55,63 \pm 7,908$ до $78,51 \pm 8,302$ mU/mg протеини), а најмала во зима ($8,19 \pm 1,227$ mU/mg протеини до $12,56 \pm 1,809$ mU/mg протеини). Ова беше случај и во рамки на групите направени зависно од здравствениот статус на млечната жлезда. Така, кај КМТ(-) крави највисоката активност на SOD за сите три периоди на земањето на пробите беше регистрирана во сезоната есен ($63,19 \pm 12,108$ mU/mg протеини до $84,98 \pm 14,510$ mU/mg протеини), а најмала активност забележавме во сезоната зима ($7,91 \pm 2,295$ mU/mg протеини до $10,94 \pm 3,793$ mU/mg протеини).

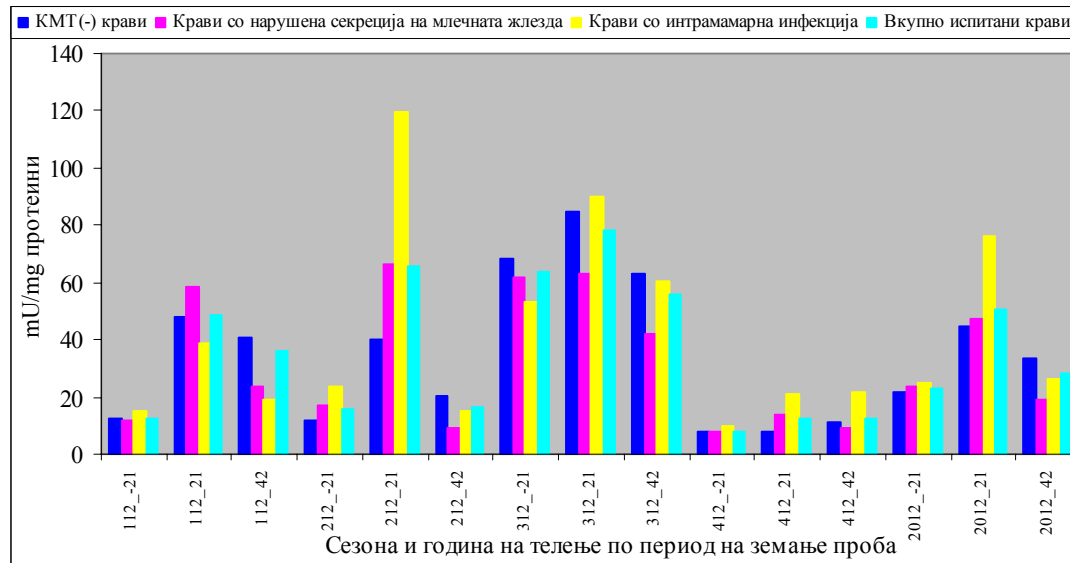
Табела 27. Специфична активност на SOD во крвниот серум на кравите во првата година на истражување, зависно од сезоната на телење и периодот на земање на пробата (mU/mg протеини)

Сезона	Период	КМТ(-)		КМТ(+)				КМТ(-) + КМТ(+)	
		n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$	НС		ИМИ		n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$
				n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$	n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$		
112	-21	18	12,48±2,655	4	11,53±2,304	2	15,27±3,810	24	12,55±2,027
	21		47,84±7,844		58,35±20,806		38,93±3,270		48,85±6,678
	42		41,00±8,121		23,58±13,842		19,20±10,065		36,29±6,637
212	-21	13	11,65±3,553	7	17,13±5,768	6	23,85±6,101	26	15,94±2,803
	21		40,20±10,174		66,18±10,486		119,50±26,646		65,49±10,219
	42		20,27±6,042		9,39±1,594		15,40±7,870		16,22±3,552
312	-21	9	68,48±8,173	6	61,47±10,674	3	53,38±14,610	18	63,63±5,735
	21		84,98±14,510		63,05±10,443		89,98±8,705		78,51±8,302
	42		63,19±12,108		41,99±13,801		60,24±13,972		55,63±7,908
412	-21	10	7,91±2,295	8	7,65±1,519	4	9,97±2,535	22	8,19±1,227
	21		7,97±0,875		14,12±3,144		20,89±5,647		12,56±1,809
	42		10,94±3,793		9,03±1,678		21,64±7,338		12,19±2,350
2012	-21	50	21,43±3,717	25	23,84±5,247	15	24,91±5,354	90	22,68±2,657
	21		44,57±5,669		47,52±6,698		76,56±15,274		50,72±4,563
	42		33,60±4,696		19,37±4,649		26,54±6,262		28,47±3,134

Кај КМТ(+) крави највисоките вредности за периодот пред телење и периодот од 22. ден до 42. ден во лактацијата, исто така, беа регистрирани во сезоната есен, и тоа 61,47±10,674 mU/mg протеини и 41,99±13,801 mU/mg протеини кај кравите со нарушена секреција, и 53,38±14,610 mU/mg протеини и 60,24±13,972 mU/mg протеини кај кравите со интрамамарна инфекција. За периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата, највисоката активност на SOD беше регистрирана во сезоната лето, 66,18±10,486 mU/mg протеини кај кравите со нарушена секреција и 119,50±26,646 mU/mg протеини кај кравите со интрамамарна инфекција. Најниска активност на SOD во крвниот серум на КМТ(+) крави беше регистрирана во сезоната зима кај кравите со нарушена секреција (7,65±1,519 mU/mg протеини до 14,12±3,144 mU/mg протеини) и 9,97±2,535 mU/mg протеини до 21,64±7,338 mU/mg протеини кај кравите со интрамамарна инфекција.

Во однос на периодот на земањето на пробите од крв за испитување, активноста на SOD во крвниот серум на кравите за целата прва година на истражување, независно од здравствениот статус на млечната жлезда, изнесуваше 22,68±25,214 mU/mg протеини кај кравите во периодот од 21 ден пред телење, 50,72±43,293 mU/mg протеини кај кравите во периодот од почетокот на лактацијата

до 21. ден во лактацијата и $28,47 \pm 29,734$ mU/mg протеини кај кравите во периодот од 22. до 42. ден во лактацијата. Генерално, во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата, активноста на SOD беше поголема кај KMT(+) во споредба со контролната група, односно со KMT(-) кравите. Исклучок е периодот од 22. ден до 42. ден во лактацијата, кога највисоката активност на SOD беше регистрирана кај KMT(-) крави.



Графикон 20. Специфична активност на SOD во крвниот серум во првата година на истражување, зависно од периодот на земање на пробата и сезоната на телење

Во Табела 28 се прикажани просечните вредности за специфичната активност на SOD во крвниот серум на испитуваната популација млечни крави, во втората година на истражување, зависно од здравствениот статус на млечната жлезда, сезоната на телење и времето на земање на пробата.

Во текот на втората календарска година на истражување, кај KMT(-) крави е задржан истиот тренд за специфичната активност на SOD во крвниот серум како и во првата година на истражување. Вредностите за активноста на SOD во крвниот серум кај оваа група крави во периодот 21 ден пред телење, во текот на целата календарска година имаше приближно воедначени вредности и изнесуваше од $17,24 \pm 4,824$ mU/mg протеини во лето до $22,55 \pm 11,299$ mU/mg протеини во зима. Во периодот од почетокот на лактацијата до 42. ден во лактацијата, највисоките вредности беа

регистрирани во пролет ($91,85 \pm 31,633$ mU/mg протеини за периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација и $47,52 \pm 9,337$ mU/mg протеини за периодот од 22. до 42. ден во лактацијата).

Табела 28. Специфична активност на SOD во крвниот серум на кравите во втората година на истражување, зависно од сезоната на телење и периодот на земање на пробата (mU/mg протеини)

Сезона	Период	КМТ(-)		КМТ(+)				КМТ(-) + КМТ(+)	
		n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$	НС		ИМИ		n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$
				n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$	n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$		
113	-21	16	19,87±6,168	11	54,82±16,091	8	60,73±29,209	35	40,19±9,062
	21		91,85±31,633		70,21±26,165		57,38±17,284		77,17±16,885
	42		47,52±9,337		29,58±6,079		48,32±10,969		42,07±6,377
213	-21	13	17,24±4,824	4	39,14±32,797	3	10,21±3,328	20	20,57±6,968
	21		45,93±14,393		5,87±1,481		20,34±14,188		34,08±10,147
	42		24,09±7,374		30,66±24,817		5,92±1,905		22,68±6,692
313	-21	24	22,05±5,052	6	16,48±5,045	9	11,27±4,045	39	18,71±3,370
	21		27,91±4,661		15,66±6,463		25,26±4,436		23,11±3,296
	42		19,97±5,332		30,26±21,608		8,84±2,447		18,98±4,635
413	-21	17	22,55±11,299	4	14,53±7,108	6	12,53±7,221	27	19,14±7,303
	21		7,99±1,977		26,21±22,221		30,25±15,410		15,63±4,897
	42		20,93±11,619		4,48±1,832		7,78±2,888		15,57±7,391
2013	-21	70	20,78±3,578	25	36,66±9,203	26	26,66±9,924	121	25,33±3,534
	21		41,03±8,511		39,78±13,008		32,27±7,294		38,89±5,794
	42		27,25±4,328		25,90±6,794		20,41±5,033		25,51±5,794

Кај КМТ(+) крави и во двете групи најголема активност на SOD во крвниот серум беше евидентирана во сезоната пролет, за сите три периоди на земање проби крв, освен за периодот од 22. ден до 42. ден во лактацијата кај кравите со нарушена секреција, кога најголемата вредност за активност на SOD беше регистрирана во сезоната есен ($30,66 \pm 24,817$ mU/mg протеини). Најниска активност на SOD во крвниот серум кај кравите со нарушена секреција беше регистрирана во сезоната зима, за периодот 21 ден пред телење и периодот од 22. ден до 42. ден во лактација, додека за периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата најниската активност беше регистрирана во есен ($5,87 \pm 1,481$ mU/mg протеини). Кај кравите со интраматарни инфекции, најниските вредности за активност на SOD во крвниот серум за сите три периоди на земање на пробите, беа регистрирани во сезоната есен ($5,92 \pm 1,905$ mU/mg протеини до $20,34 \pm 14,188$ mU/mg протеини).

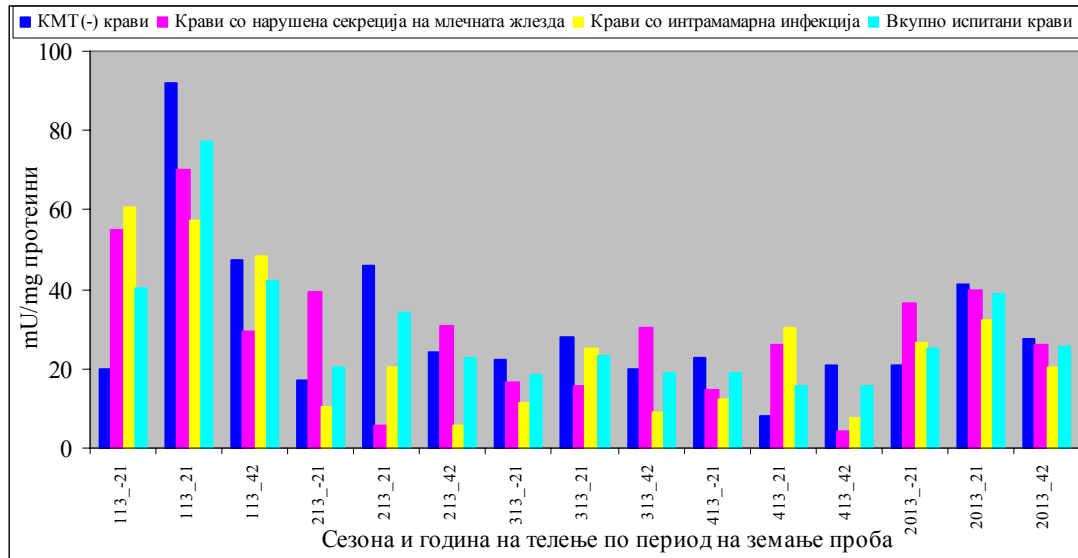
Генерално, може да се констатира дека независно од здравствениот статус на млечната жлезда, најголемата активност на SOD во крвниот серум во втората година

на истражување, за сите три периоди на земање проби крв, беше регистрирана во сезоната пролет ($40,19 \pm 9,062$ mU/mg протеини до $77,17 \pm 16,885$ mU/mg протеини) а најниска во сезоната зима ($15,57 \pm 7,391$ mU/mg протеини до $15,63 \pm 4,897$ mU/mg протеини), со исклучок на периодот 21 ден пред телење, кога најниската активност беше регистрирана во сезоната есен ($18,71 \pm 3,370$ mU/mg протеини).

На ниво на целата втора календарска година на истражување, активността на SOD во крвниот серум на КМТ(+) крави беше пониска ($20,41 \pm 5,033$ mU/mg протеини до $39,78 \pm 13,008$ mU/mg протеини) во споредба со активността на ензимот кај КМТ(-) крави ($27,25 \pm 4,328$ mU/mg протеини до $41,03 \pm 8,511$ mU/mg протеини) во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден, односно од 22. ден до 42. ден во лактацијата. Кај КМТ(+) крави не може да се забележи дефиниран тек во специфичната активност на ензимот, но евидентен е големо намалување на активността, кое во одредени сезони од годината настанува во периодот по телење, додека во некои сезони настанува во подоцнежниот период во лактација. Меѓутоа, активността на SOD во периодот 21 ден пред телење кај КМТ(+) крави имаше поголеми вредности ($26,66 \pm 9,924$ mU/mg протеини до $36,66 \pm 9,203$ mU/mg протеини) во однос на активността на ензимот кај КМТ(-) крави ($20,78 \pm 3,578$ mU/mg протеини).

Вкупно, за целата популација испитувани крави во втората календарска година, независно од здравствениот статус на млечната жлезда, активността на SOD во крвниот серум на кравите пред телење изнесуваше $25,33 \pm 3,534$ mU/mg протеини, во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата $38,89 \pm 5,794$ mU/mg протеини и во периодот од 22. до 42. ден во лактацијата $25,51 \pm 5,794$ mU/mg протеини.

Сликовито специфичната активност на SOD во крвниот серум кај различните групи испитувани крави во втората календарска година на истражување е дадена во Графиконот 21.



Графикон 21. Специфична активност на SOD во крвниот серум во втората година на истражување, зависно од сезоната на телење и периодот на земање на пробата

Во Табела 29 збирно е прикажана специфичната активност на SOD во крвниот серум на опитните крави, зависно од периодот на земање на пробата за двете календарски години на истражување.

Табела 29. Специфична активност на SOD во крвниот серум на кравите зависно од периодот на земање на пробата (mU/mg протеини)

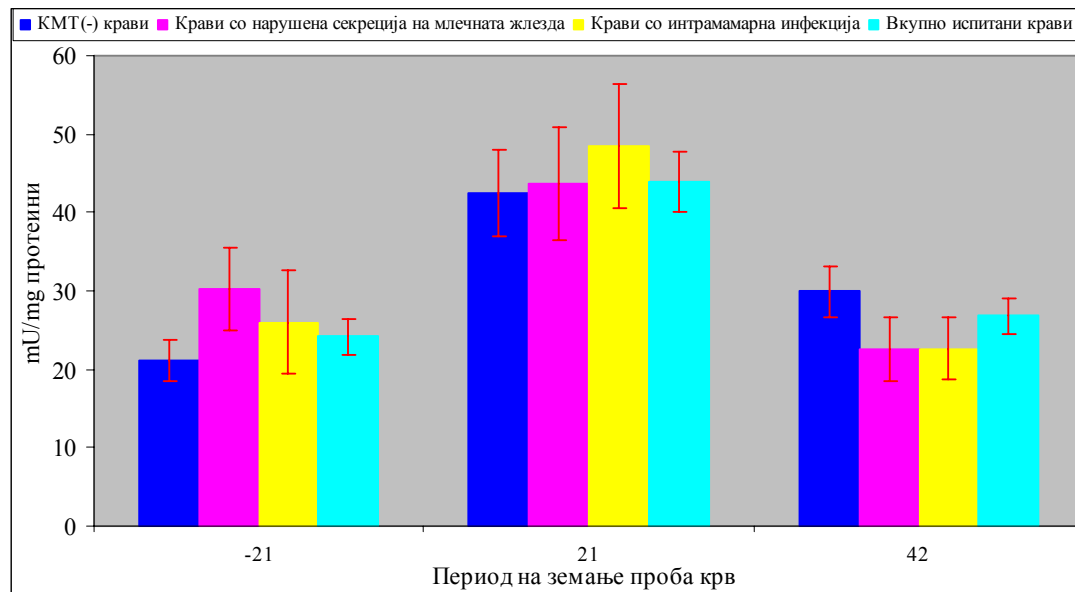
Примерок	Период	KMT(-)		KMT(+)				KMT(-) + KMT(+)	
		n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$	НС		ИМИ		n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$
				n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$	n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$		
Крвен серум	-21	120	21,05±2,589	50	30,25±5,322	41	26,02±6,536	211	24,20±2,319
	21		42,51±5,481		43,65±7,262		48,47±7,895		43,94±3,864
	42		29,90±3,194		22,64±4,101		22,65±3,909		26,77±2,201

Активноста на SOD во крвниот серум на кравите во периодот 21 ден пред телење и во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата кај KMT(+) крави беше повисока (30,25±5,322 mU/mg протеини односно 43,65±7,262 mU/mg протеини кај кравите со нарушена секреција на млечната жлезда и 26,02±6,536 mU/mg протеини, односно 48,47±7,895 mU/mg протеини кај кравите со интрамамарна инфекција) во споредба со KMT(-) крави (21,05±2,589 mU/mg

протеини, односно $42,51 \pm 5,481$ mU/mg протеини). Вкупно, независно од здравствениот статус на млечната жлезда, активноста на SOD во крвниот серум на кравите во периодот 21 ден пред телењето изнесуваше $24,20 \pm 2,319$ mU/mg протеини, а во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата изнесуваше $43,94 \pm 3,864$ mU/mg протеини.

Спротивно на овие два периоди, активноста на SOD во крвниот серум на кравите во периодот од 22. до 42. ден во лактацијата беше пониска кај КМТ(+) крави ($22,64 \pm 4,101$ mU/mg протеини кај кравите со нарушена секреција на млечната жлезда и $22,65 \pm 3,909$ mU/mg протеини кај кравите со интрамамарна инфекција) во споредба со КМТ(-) крави ($29,90 \pm 3,194$ mU/mg протеини). Независно од здравствениот статус на млечната жлезда, активноста на SOD во крвниот серум на кравите во периодот од 22. до 42. ден во лактацијата изнесуваше $26,77 \pm 2,201$ mU/mg протеини.

Сликовито, специфичната активност на SOD во крвниот серум на кравите, за целиот период на истражување, дадена е во Графикон 22.



Графикон 22. Специфична активност на SOD во крвниот серум за целиот период на истражување, зависно од периодот на земање на пробата

5.5.1.2. АКТИВНОСТ НА ГЛУТАТИОН ПЕРОКСИДАЗАТА (GPx)

Добиените резултати за специфичната активност на ензимот глутатион пероксидаза (GPx) во крвниот серум на испитуваната популација млечни крави, зависно од здравствениот статус на млечната жлезда, сезоната на телење и периодот на земање на пробите за првата година на истражување се прикажани во Табела 30.

Табела 30. Специфична активност на GPx во крвниот серум на кравите во првата година на истражување, зависно од сезоната на телење и периодот на земање на пробата (mU/mg протеини)

Сезона	Период	КМТ(-)		КМТ(+)				КМТ(-) + КМТ(+)	
		n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$	НС		ИМИ		n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$
				n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$	n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$		
112	-21	18	121,32±5,232	4	144,78±8,637	2	138,16±23,515	24	126,63±4,753
	21		166,90±6,579		213,33±9,336		186,99±17,755		176,31±6,345
	42		142,26±4,625		158,80±13,636		129,57±20,899		143,96±4,464
212	-21	13	502,23±9,761	7	440,06±7,451	6	478,68±23,881	26	480,06±8,936
	21		799,91±28,011		959,96±15,927		1020,12±18,514		893,82±24,316
	42		797,34±10,097		407,74±4,896		404,20±19,881		601,72±39,685
312	-21	9	162,62±9,453	6	161,81±17,192	3	121,61±7,247	18	155,52±8,035
	21		249,54±3,941		291,17±32,840		292,71±55,778		270,62±18,103
	42		163,08±23,246		125,29±31,979		172,84±43,563		152,11±16,925
412	-21	10	332,23±35,493	8	398,84±64,393	4	406,42±72,386	22	369,94±30,674
	21		462,56±8,119		549,78±97,686		758,21±98,357		548,03±48,986
	42		396,77±65,063		489,86±75,757		714,84±139,015		488,46±51,458
2012	-21	50	269,97±23,772	25	312,84±33,332	15	342,60±45,717	90	293,99±17,889
	21		405,49±38,776		548,73±65,957		693,71±92,518		493,32±33,810
	42		367,23±41,117		326,40±40,216		404,15±67,381		362,05±27,654

Во однос на сезоните на телење во првата година на истражување, највисока активност на ензимот глутатион пероксидаза е евидентирана во лето (440,06±7,451 mU/mg протеини до 1020,12±18,514 mU/mg протеини), независно од здравствениот статус на млечната жлезда, за сите три периоди на земање на пробите, освен за периодот од 22. ден до 42. ден во лактацијата кај КМТ(+) крави. Најниска активност на ензимот беше регистрирана во сезоната пролет, независно од здравствениот статус на млечната жлезда, за сите периоди на земање на пробите, освен за периодот пред телење за кравите со интрамамарна инфекција и периодот од 22. ден до 42. ден во лактацијата за кравите со нарушена секреција, кога најниска активност беше

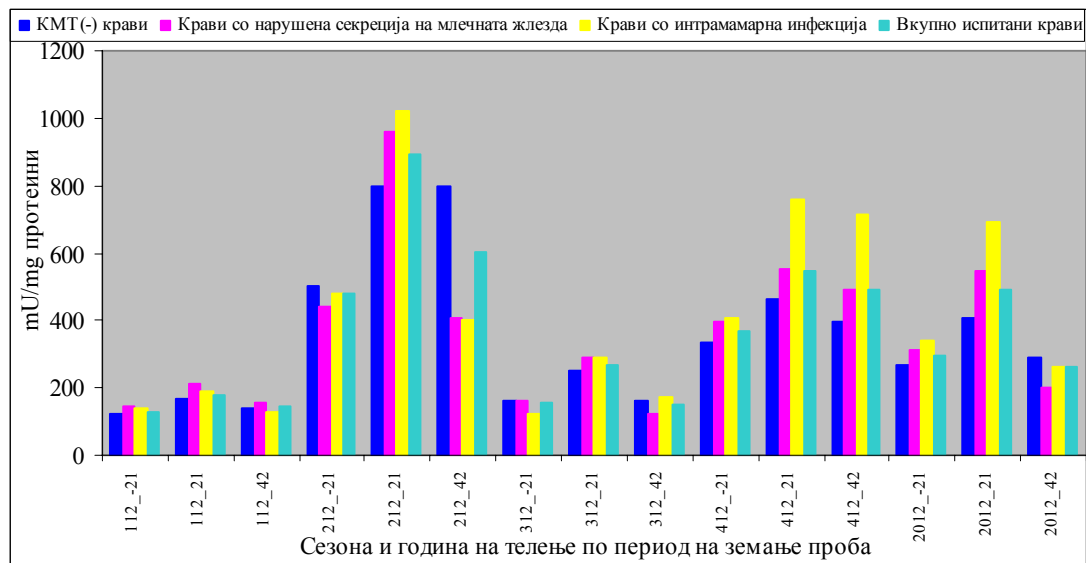
евидентирани во сезоната есен ($121,61 \pm 7,247$ mU/mg протеини), односно во сезоната зима ($125,29 \pm 31,979$ mU/mg протеини).

Независно од сезоната на телење кај сите групи крави, активноста на GPx е зголемена во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата во споредба со периодот 21 ден пред телење. Во периодот од 22. до 42. ден во лактацијата, активноста на ензимот во крвниот серум е пониска во однос на почетниот период од лактацијата, а повисока во споредба со периодот пред телење.

Активноста на GPx беше поголема во крвниот серум кај КМТ(+) крави во споредба со КМТ(-) крави.

Вкупно, за целата популација испитувани крави во првата календарска година, специфичната активност на GPx во крвниот серум на кравите пред телење изнесуваше $293,99 \pm 17,889$ mU/mg протеини, во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата $493,32 \pm 33,810$ mU/mg протеини, и во периодот од 22. до 42. ден во лактацијата $362,05 \pm 27,654$ mU/mg протеини.

Сликовито специфичната активност на GPx во крвниот серум, кај различните групи опитни крави во првата година на истражување е дадена во Графиконот 23.



Графикон 23. Специфична активност на GPx во крвниот серум во првата година на истражување, зависно од периодот на земање на пробата и сезоната на телење

Просечните вредности за специфичната активност на GPx во крвниот серум на испитуваната популација млечни крави, зависно од здравствениот статус на млечната жлезда, сезоната на телење и периодот на земање на пробите, за втората година на истражување се прикажани во Табела 31.

Табела 31. Специфична активност на GPx во крвниот серум на кравите во втората година на истражување, зависно од сезоната на телење и периодот на земање на пробата (mU/mg протеини)

Сезона	Период	КМТ(-)		КМТ(+)				КМТ(-) + КМТ(+)	
		n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$	НС		ИМИ		n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$
				n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$	n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$		
113	-21	16	177,48±14,504	11	230,00±34,039	8	221,89±33,707	35	204,13±14,861
	21		196,67±13,328		268,59±37,384		245,21±42,776		230,37±16,774
	42		188,08±10,296		252,55±32,732		271,31±37,496		227,37±15,039
213	-21	13	266,07±28,367	4	296,31±38,943	3	322,54±57,135	20	280,59±21,295
	21		435,75±35,917		431,89±33,378		447,06±27,639		436,68±24,041
	42		416,70±30,649		398,04±36,036		459,34±12,714		424,77±21,886
313	-21	24	181,77±10,413	6	163,09±11,346	9	180,19±9,951	39	178,54±6,996
	21		231,17±19,577		203,05±7,422		218,13±5,449		223,84±12,171
	42		229,38±16,232		226,38±18,126		276,25±19,729		239,74±11,587
413	-21	17	270,43±31,483	4	177,36±19,246	6	273,78±38,006	27	257,39±22,249
	21		333,56±44,460		277,56±70,738		313,63±38,656		320,84±30,501
	42		298,08±56,356		319,16±134,458		443,51±78,253		333,53±44,003
2013	-21	70	217,98±11,511	25	216,13±18,470	26	231,05±17,262	121	220,41±8,472
	21		286,15±17,757		280,43±24,429		274,92±21,049		282,55±12,229
	42		271,42±18,321		280,21±27,314		338,61±27,808		287,67±13,532

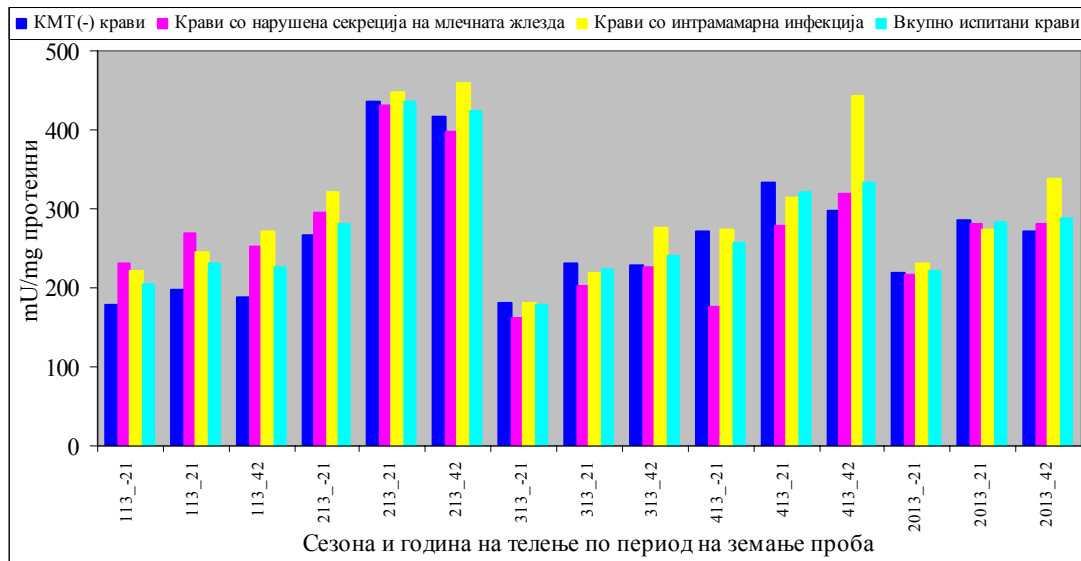
Во текот на втората календарска година на истражување, задржан е истиот тренд за активноста на ензимот глутатион пероксидаза во крвниот серум како и во првата година на истражување. Имено, и во втората година на истражување, како и во првата, во однос на сезоните на телење, највисока активност на GPx е евидентирана во лето (296,31±38,943 mU/mg протеини до 459,34±12,714 mU/mg протеини), независно од здравствениот статус на млечната жлезда за сите периоди на земање на пробите, освен за периодот пред телење за КМТ(-) крави, кога највисоката активност беше регистрирана во зима (270,43±31,483 mU/mg протеини). За разлика од првата година на истражување, просечните најниски вредности за активноста на GPx покажуваат поинаква дистрибуција во однос на сезоните од календарската година. Така, слично како и во првата година на истражување, најниска активност кај КМТ(-) крави беше регистрирана во сезоната пролет (177,48±14,504 mU/mg протеини до 196,67±13,328 mU/mg протеини). Кај КМТ(+)

крави, како за кравите со нарушена секреција, така и за кравите со интрамамарна инфекција, најниските вредности беа регистрирани во сезоната есен (163,09±11,346 mU/mg протеини до 226,38±18,126 mU/mg протеини).

Активноста на GPx и во втората година од истражувањата, беше поголема кај КМТ(+) крави во споредба со КМТ(-) крави.

Вкупно, за целата популација испитувани крави во втората календарска година, специфичната активност на GPx во крвниот серум пред телење изнесуваше 220,41±8,472 mU/mg протеини, во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во латацијата 282,55±12,229 mU/mg протеини и во периодот од 22. до 42. ден во лактацијата 287,67±13,532 mU/mg протеини.

Сликовито, специфичната активност на GPx во крвниот серум, кај различните групи опитни крави во втората календарска година на истражување, е даден во Графиконот 24.



Графикон 24. Специфична активност на GPx во крвниот серум во втората година на истражување, зависно од сезоната на телење и периодот на земање на пробата

Во Табела 32 збирно е прикажана специфичната активност на GPx во крвниот серум, зависно од периодот на земање на пробата за двете календарски години на истражување.

Табела 32. Специфична активност на GPx во крвниот серум на кравите зависно од периодот на земање на пробата (mU/mg протеини)

Примерок	Период	КМТ(-)		КМТ(+)				КМТ(-) + КМТ (+)	
		n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$	НС		ИМИ		n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$
				n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$	n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$		
Крвен серум	-21	120	239,65±12,137	50	264,48±20,084	41	271,86±21,399	211	251,79±9,363
	21		335,87±19,842		414,58±39,734		428,14±47,843		372,45±17,533
	42		311,34±20,551		303,31±24,283		362,59±30,212		319,40±14,307

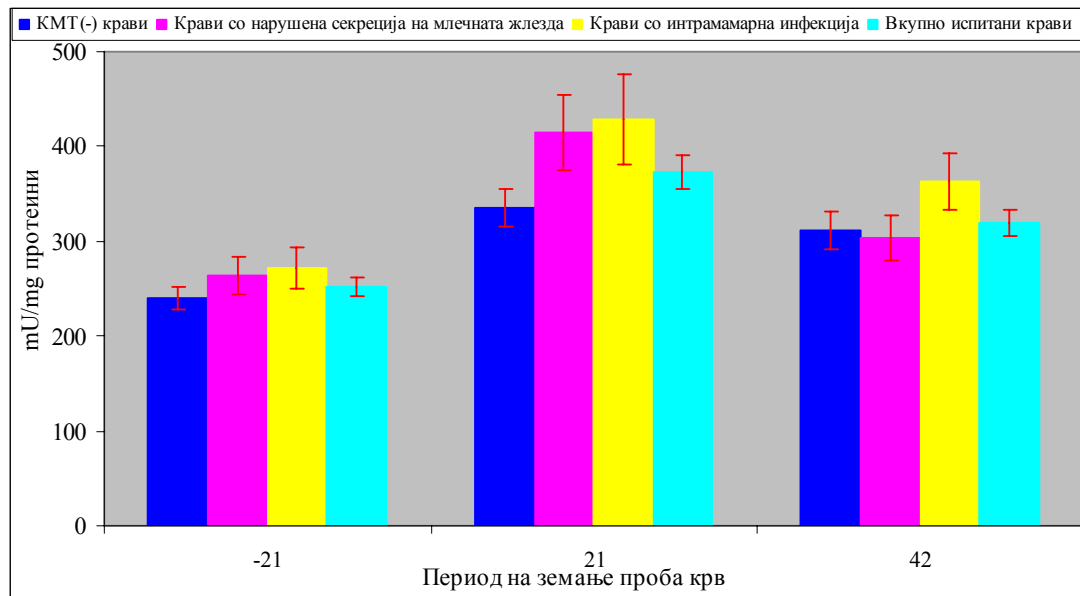
Активноста на GPx во крвниот серум на кравите во периодот 21 ден пред телење и во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата кај КМТ(+) крави беше повисока (264,48±20,084 mU/mg протеини, односно 414,58±39,734 mU/mg протеини кај кравите со нарушена секреција на млечната жлезда и 271,86±21,399 mU/mg протеини, односно 428,14±47,843 mU/mg протеини кај кравите со интрамамарна инфекција) во споредба со КМТ(-) крави (239,65±12,137 mU/mg протеини, односно 335,87±19,842 mU/mg протеини). Вкупно, независно од здравствениот статус на млечната жлезда, активноста на GPx во крвниот серум на кравите во периодот 21 ден пред телењето изнесуваше 251,79±9,363 mU/mg протеини, а во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација изнесуваше 372,45±17,533 mU/mg протеини.

Најголема активност на GPx во крвниот серум на кравите во периодот од 22. до 42. ден во лактација беше регистрирана кај кравите со интрамамарна инфекција (362,59±30,212 mU/mg протеини), а КМТ(-) крави имаа нешто поголема активност на GPx (311,34±20,551 mU/mg протеини) во споредба со кравите со нарушена секреција на млечната жлезда (303,31±24,283 mU/mg протеини). Вкупно, независно од здравствениот статус на млечната жлезда, активноста на GPx во крвниот серум на кравите во периодот од 22. до 42. ден во лактација изнесуваше 319,40±14,307 mU/mg протеини.

Генерално, активноста на GPx во крвниот серум, независно од здравствениот статус на млечната жлезда, пред телење беше пониска во споредба со периодите по

телење до 42. ден во лактацијата. Активноста на GPx во крвниот серум беше зголемена кај КМТ(+) крави во споредба со контролната група, КМТ(-) крави.

Сликовито, специфичната активност на GPx во крвниот серум на кравите за целиот период на истражување е дадена во Графикон 25.



Графикон 25. Специфична активност на GPx во крвниот серум за целиот период на истражување, зависно од периодот на земање на пробата

5.5.2. АКТИВНОСТ НА ЕНЗИМИТЕ НА ОКСИДАТИВЕН СТРЕС ВО МЛЕЧНИОТ СЕРУМ

Ензимите на оксидативен стрес во млечниот серум на кравите беа одредувани со истите спектрофотометриски кинетички методи кои се користеа за одредување на нивната активност во крвниот серум, со таа разлика што на овие методи беа направени одредени модификации, заради нивна поголема сензитивност. Пробите млеко од кравите беа земани во два периоди во лактацијата, и тоа: периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата и периодот од 22. ден до 42. ден во лактацијата.

5.5.2.1. АКТИВНОСТ НА СУПЕРОКСИД ДИСМУТАЗАТА (SOD)

Резултатите за специфичната активност на ензимот супероксид дисмутаза (SOD) во млечниот серум на испитуваната популација млечни крави во првата година на истражување, зависно од здравствениот статус на млечната жлезда, сезоната на телење и периодот на земање на пробите се прикажани во Табела 33.

Табела 33. Специфична активност на SOD во млечниот серум на кравите во првата година на истражување, зависно од сезоната на телење и периодот на земање на пробата (mU/mg протеини)

Сезона	Период	КМТ(-)		КМТ(+)				КМТ(-) + КМТ(+)	
		n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$	НС		ИМИ		n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$
				n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$	n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$		
112	21	18	60,24±10,576	4	45,04±18,046	2	67,98±7,014	24	58,35±8,426
	42		43,14±8,302		25,14±13,043		92,00±0,029		44,21±7,270
212	21	13	45,44±10,135	7	72,15±14,250	6	55,36±22,202	26	54,92±8,095
	42		20,42±4,036		35,93±13,925		35,50±11,089		28,07±4,946
312	21	9	34,45±6,957	6	18,30±4,121	3	32,62±11,068	18	28,76±4,324
	42		32,55±3,134		41,32±14,537		30,06±12,509		35,06±5,224
412	21	10	20,22±4,813	8	28,46±5,980	4	22,92±11,982	22	23,71±3,638
	42		21,00±3,178		19,20±5,324		15,24±1,4285		19,30±2,379
2012	21	50	43,75±5,232	25	40,91±6,602	15	43,85±10,102	90	42,98±3,786
	42		30,89±3,521		30,14±5,796		36,54±7,792		31,63±2,821

Најголема активност на SOD во млечниот серум на кравите независно од здравствениот статус на млечната жлезда, во двата периода на земањето на пробите

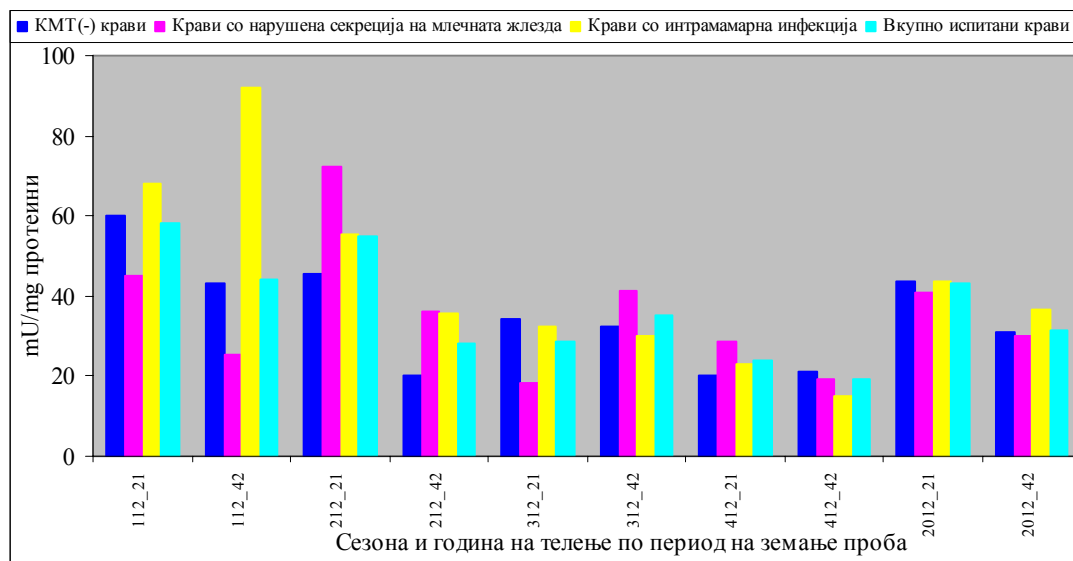
за испитување, беше регистрирана во сезоната пролет ($44,21 \pm 7,270$ mU/mg протеини до $58,35 \pm 8,426$ mU/mg протеини), а најмала во сезоната зима ($19,30 \pm 2,379$ mU/mg протеини до $23,71 \pm 3,638$ mU/mg протеини). Ова беше случај и во рамки на групите направени зависно од здравствениот статус на млечната жлезда, со исклучок на најголемата активност на SOD во млечниот серум на кравите со нарушена секреција на млечната жлезда. Така, кај KMT(-) крави највисоката активност на SOD за двата периода на земањето на пробите беше регистрирана во сезоната пролет и изнесуваше од $43,14 \pm 8,302$ mU/mg протеини до $60,24 \pm 10,576$ mU/mg протеини, а најмала активност беше регистрирана во зима и изнесуваше од $20,22 \pm 4,813$ mU/mg протеини до $21,00 \pm 3,178$ mU/mg протеини. Кај кравите со нарушена секреција на млечната жлезда највисока активност на SOD во млечниот серум, во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација беше регистрирана во сезоната лето ($72,15 \pm 14,250$ mU/mg протеини) а во периодот од 22. до 42. ден во лактација, највисока активност беше регистрирана во сезоната есен ($41,32 \pm 14,537$ mU/mg протеини). Највисока активност на SOD во млечниот серум на кравите со интрамамарна инфекција, во двата периода на земањето на пробите за испитување, беше регистрирана во сезоната зима ($67,98 \pm 7,014$ mU/mg протеини до $92,00 \pm 0,029$ mU/mg протеини). Најниска активност на SOD во млечниот серум на KMT(+) крави беше регистрирана во сезоната зима, и тоа $19,20 \pm 5,324$ mU/mg протеини до $28,46 \pm 5,980$ mU/mg протеини кај кравите со нарушена секреција и $15,24 \pm 1,4285$ mU/mg протеини до $22,92 \pm 11,982$ mU/mg протеини кај кравите со интрамамарна инфекција.

Во однос на периодот на земањето на пробите од млеко за испитување, независно од здравствениот статус на млечната жлезда, активноста на SOD во млечниот серум беше повисока во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација ($42,98 \pm 3,786$ mU/mg протеини), додека во периодот од 22. до 42. ден во лактација изнесуваше $31,63 \pm 2,821$ mU/mg протеини. Така, во контролната група KMT(-) крави, независно од сезоната на телење, специфичната активност на SOD во периодот по телењето до 21. ден во лактација беше повисока ($43,75 \pm 5,232$ mU/mg протеини) во споредба со периодот од 22. до 42. ден во лактација ($30,89 \pm 3,521$ mU/mg протеини). Истиот тренд, независно од сезоните на телење, се забележува и во групата KMT(+) крави, односно крави со нарушена секреција на млечната жлезда и крави со интрамамарна инфекција. Активноста на SOD во млечниот серум на

кравите со нарушена секреција на млечната жлезда во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација изнесуваше $40,91 \pm 6,602$ mU/mg протеини, а во периодот од 22. до 42. ден во лактација изнесуваше $30,14 \pm 5,796$ mU/mg протеини. Активноста на SOD во млечниот серум на кравите со интрамамарна инфекција во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација изнесуваше $43,85 \pm 10,102$ mU/mg протеини, а во периодот од 22. до 42. ден во лактација изнесуваше $36,54 \pm 7,792$ mU/mg протеини.

Генерално, на ниво на првата година на истражување, може да се констатира дека не постоеше голема разлика во активноста на SOD во млечниот серум меѓу испитуваните групи на крави.

Сликовито, специфичната активност на SOD во млечниот серум на кравите во првата година на истражување е дадена во Графикон 26.



Графикон 26. Специфична активност на SOD во млечниот серум во првата година на истражување, зависно од сезоната на телење и периодот на земање на пробата

Во Табела 34 се прикажани просечните вредности за специфичната активност на SOD во млечниот серум на испитуваната популација млечни крави, во втората година на истражување, зависно од здравствениот статус на млечната жлезда, сезоната на телење и периодот на земање на пробата.

Табела 34. Специфична активност на SOD во млечниот серум на кравите во втората година на истражување, зависно од сезоната на телење и периодот на земање на пробата (mU/mg протеини)

Сезона	Период	КМТ(-)		КМТ(+)				КМТ(-) + КМТ(+)	
		n	$(\bar{x} \pm S_x)$	НС		ИМИ		n	$(\bar{x} \pm S_x)$
				n	$(\bar{x} \pm S_x)$	n	$(\bar{x} \pm S_x)$		
113	21	16	30,55±8,046	11	63,85±32,704	8	135,81±33,874	35	65,08±14,683
	42		26,20±4,648		94,31±43,531		86,37±29,701		61,36±15,871
213	21	13	144,94±35,636	4	394,74±180,304	3	328,28±213,690	20	222,40±53,622
	42		120,09±41,488		102,37±52,152		233,54±103,286		133,56±36,018
313	21	24	142,42±25,787	6	173,71±21,203	9	181,36±36,065	39	156,22±18,115
	42		147,57±27,574		286,85±95,979		259,56±69,664		195,85±28,309
413	21	17	114,35±11,270	4	58,94±20,270	6	79,49±35,811	27	98,39±11,364
	42		141,84±18,096		107,01±36,041		178,91±76,631		144,91±20,453
2013	21	70	110,50±12,525	25	142,38±38,351	26	160,79±30,457	121	127,89±12,579
	42		113,33±13,998		143,84±34,035		184,67±36,496		134,96±13,397

Во текот на втората календарска година на истражување постојат поголеми разлики во однос на активноста на SOD во млечниот серум на кравите споредено со активноста во првата година.

Кај сите групи на крави, независно од здравствениот статус на млечната жлезда, најголема активност на SOD во млечниот серум во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација беше регистрирана во сезоната лето, при што активноста на SOD беше двојно повисока кај КМТ(+) крави во споредба со КМТ (-) крави, и изнесуваше 394,74±180,304 mU/mg протеини кај кравите со нарушена секреција, 328,28±213,690 mU/mg протеини кај кравите со интрамамари инфекции и 144,94±35,636 mU/mg протеини кај КМТ(-) крави. Најголема активност на SOD во млечниот серум во периодот од 22. до 42. ден во лактација, кај сите групи на крави, независно од здравствениот статус на млечната жлезда, беше регистрирана во сезоната лето. Активноста на SOD во млечниот серум на КМТ(-) крави повторно беше двојно пониска (147,57±27,574 mU/mg протеини) во споредба со активноста кај КМТ(+) крави, која изнесуваше 286,85±95,979 mU/mg протеини кај кравите со здравствени нарушувања на млечната жлезда и 259,56±69,664 mU/mg протеини кај кравите со интрамамари инфекции.

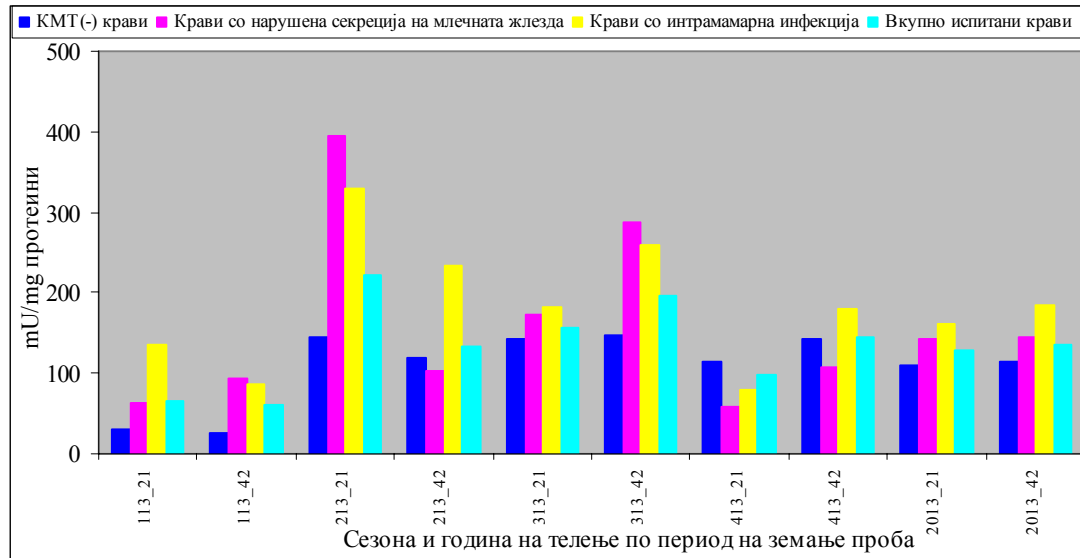
Најниска активност на SOD во млечниот серум, кај сите групи на крави, како и независно од здравствениот статус на млечната жлезда, во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација, беше евидентиран во сезоната пролет, со исклучок на кравите со интрамамари инфекции, кога најниска активност беше

регистрирана во сезоната зима. Така, најниската активност на SOD во млечниот серум во овој период изнесуваше $30,55 \pm 8,046$ mU/mg протеини кај КМТ(-) крави, $63,85 \pm 32,704$ mU/mg протеини кај кравите со нарушена секреција, $79,49 \pm 35,811$ mU/mg протеини кај кравите со интрамамарна инфекција. Вкупно, независно од здравствениот статус на млечната жлезда, активноста на SOD во млечниот серум, во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација изнесуваше $65,08 \pm 14,683$ mU/mg протеини. Кај сите групи на крави, независно од здравствениот статус на млечната жлезда, најниска активност на SOD во млечниот серум во периодот од 22. до 42. ден во лактација, беше евидентиран во сезоната пролет ($61,36 \pm 15,871$ mU/mg протеини).

Во однос на периодот на земањето на пробите млеко за испитување, независно од сезоната на телење, активноста на SOD во млечниот серум во текот на втората календарска година на истражување имаше спротивен тренд од првата година, односно кај сите групи на крави беше пониска во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата во споредба со периодот од 22. до 42. ден во лактацијата. Вкупно, за целата популација испитувани крави во втората календарска година, независно од здравствениот статус на млечната жлезда, активноста на SOD во млечниот серум на кравите во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата изнесуваше $127,89 \pm 12,579$ mU/mg протеини и во периодот од 22. до 42. ден во лактацијата $134,96 \pm 13,397$ mU/mg протеини.

Генерално, во втората година на истражување, активноста на SOD во млечниот серум имаше големи варијации во споредба со регистрираната активност на ензимот во првата година, особено кај КМТ(+) крави.

Сликвито, специфичната активност на SOD во млечниот серум на кравите во втората година на истражување е дадена во Графиконот 27.



Графикон 27. Специфична активност на SOD во млечниот серум во втората година на истражување, зависно од сезоната на телење и периодот на земање на пробата

Во Табела 35 збирно е прикажана специфичната активност на SOD во млечниот серум на опитните крави, зависно од периодот на земање на пробата за двете календарски години на истражување.

Табела 35. Специфична активност на SOD во млечниот серум на кравите зависно од периодот на земање на пробата (mU/mg протеини)

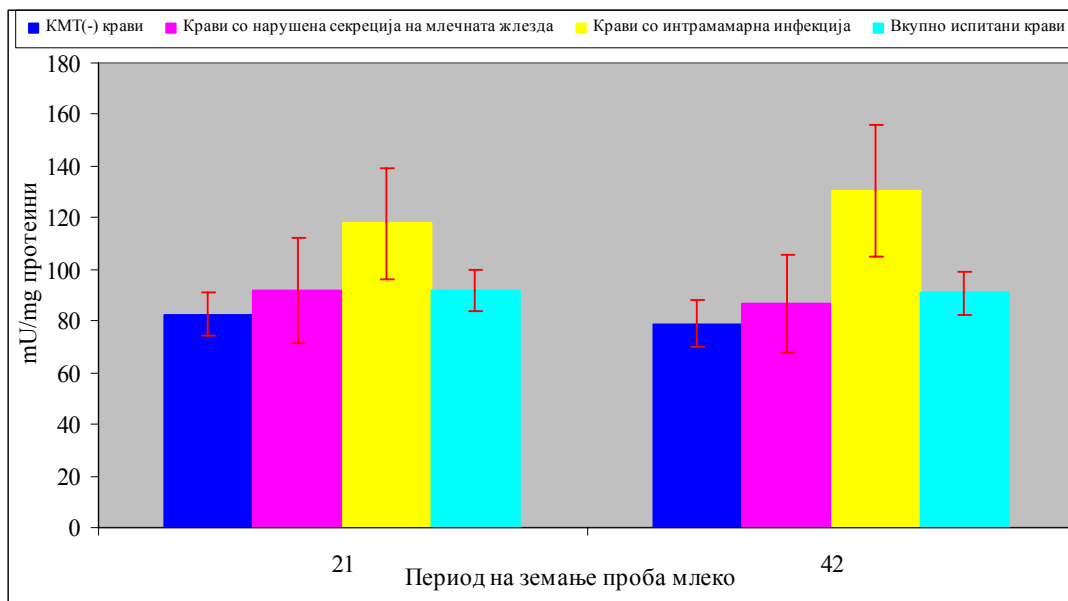
Примерок	Период	KMT(-)		KMT(+)				KMT(-) + KMT(+)	
		n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$	НС		ИМИ		n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$
				n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$	n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$		
Млечен серум	21	120	82,69±8,176	50	91,64±20,577	41	118,00±21,449	211	91,67±7,927
	42		78,98±9,071		86,99±18,917		130,48±25,748		90,89±8,526

Активноста на SOD во млечниот серум кај KMT(+) крави беше повисока и во двата периода на земање на пробите во споредба со KMT(-) крави. Така, активноста на SOD во млечниот серум од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација изнесуваше 91,64±20,577 mU/mg протеини кај кравите со нарушена секреција на млечната жлезда и 118,00±21,449 mU/mg протеини кај кравите со интрамамарна инфекција, додека во периодот од 22. до 42. ден во лактацијата активноста на SOD изнесуваше 86,99±18,917 mU/mg протеини кај кравите со нарушена секреција на

млечната жлезда и $130,48 \pm 25,748$ mU/mg протеини. Кај кравите со ИМИ, активноста на SOD во млечниот серум кај KMT(-) крави за периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата изнесуваше $82,69 \pm 8,176$ mU/mg протеини, а во периодот од 22. до 42. ден $78,98 \pm 9,071$ mU/mg протеини.

Независно од здравствениот статус на млечната жлезда, активноста на SOD во млечниот серум на кравите во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата изнесуваше $91,67 \pm 7,927$ mU/mg протеини и $90,89 \pm 8,526$ mU/mg протеини во периодот од 22. до 42. ден во лактацијата. Регистрираната активност на SOD во млечниот серум на кравите беше за 2-3 пати повисока во споредба со активноста на ензимот во крвниот серум на кравите.

Сликовито, специфичната активност на SOD во млечниот серум на кравите, за целиот период на истражување е дадена во Графикон 28.



Графикон 28. Специфична активност на SOD во млечниот серум за целиот период на истражување зависно од периодот на земање на пробата

5.5.2.2. АКТИВНОСТ НА ГЛУТАТИОН ПЕРОКСИДАЗАТА (GPx)

Резултатите за специфичната активност на глутатион пероксидазата (GPx) во млечниот серум на испитуваната популација млечни крави, во првата година на истражување, зависно од здравствениот статус на млечната жлезда, сезоната на телење и периодот на земање на пробата се прикажани во Табела 36.

Најголема активност на GPx во млечниот серум на кравите, независно од здравствениот статус на млечната жлезда, во двата периода на земањето на пробите за испитување, беше регистрирана во сезоната лето ($533,65 \pm 27,101$ mU/mg протеини до $642,53 \pm 33,020$ mU/mg протеини), а најмала во сезоната пролет ($97,04 \pm 9,304$ mU/mg протеини до $108,94 \pm 16,178$ mU/mg протеини). Ова беше случај и во рамки на групите направени зависно од здравствениот статус на млечната жлезда.

Табела 36. Специфична активност на GPx во млечниот серум на кравите во првата година на истражување, зависно од сезоната на телење и периодот на земање на пробата (mU/mg протеини)

Сезона	Период	КМТ(-)		КМТ(+)				КМТ(-) + КМТ(+)	
		n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$	НС		ИМИ		n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$
				n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$	n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$		
112	21	18	97,45±9,515	4	99,76±34,438	2	87,80±53,109	24	97,04±9,304
	42		80,76±4,989		206,52±79,021		167,42±36,750		108,94±16,178
212	21	13	605,69±15,941	7	433,31±62,498	6	494,64±53,090	26	533,65±27,101
	42		591,55±23,924		611,75±75,444		788,89±83,948		642,53±33,020
312	21	9	343,15±71,16	6	220,53±36,508	3	236,39±70,489	18	284,49±40,295
	42		194,61±28,279		206,79±42,361		241,09±39,258		206,42±20,254
412	21	10	401,96±43,432	8	356,03±27,257	4	389,98±45,084	22	383,08±23,046
	42		323,41±39,387		315,61±38,988		323,48±63,895		320,59±24,355
2012	21	50	334,72±32,673	25	304,15±32,896	15	360,83±46,331	90	330,58±21,630
	42		282,59±31,001		354,96±43,719		472,36±78,940		334,32±25,578

Така, највисоката активност на GPx кај КМТ(-), за двата периода на земањето на пробите беше регистрирана во сезоната лето и изнесуваше од $591,55 \pm 23,924$ mU/mg протеини до $605,69 \pm 15,941$ mU/mg протеини, а најмала активност беше регистрирана во сезоната пролет ($80,76 \pm 4,989$ mU/mg протеини до $97,45 \pm 9,515$ mU/mg протеини). Кај КМТ(+) крави, исто така, најголема активност на GPx во млечниот серум, во двата периоди, беше регистрирана во сезоната лето, а најниска во сезоната пролет. Така, кај кравите со нарушена секреција на млечната жлезда

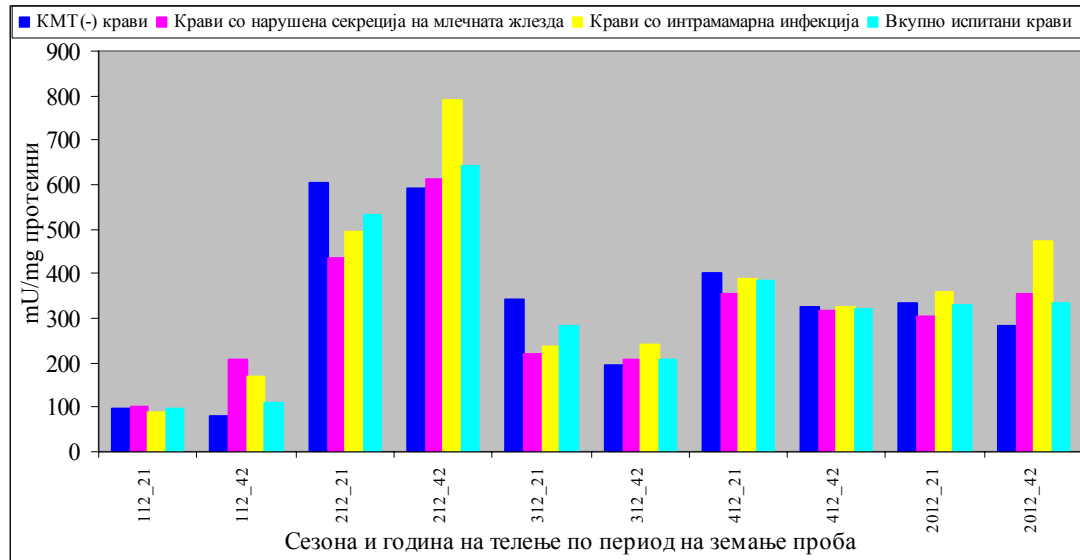
највисоката регистрирана активност на GPx во млечниот серум беше од $433,31 \pm 62,498$ mU/mg протеини до $611,75 \pm 75,444$ mU/mg протеини, а најмалата активност од $99,76 \pm 34,438$ mU/mg протеини до $206,52 \pm 79,021$ mU/mg протеини. Кај кравите со интрамамарна инфекција највисоката регистрирана активност на GPx во млечниот серум беше од $494,64 \pm 53,090$ mU/mg протеини до $788,89 \pm 83,948$ mU/mg протеини, а најмалата активност од $87,80 \pm 53,109$ mU/mg протеини до $167,42 \pm 36,750$ mU/mg протеини.

Евидентно е дека кај КМТ(-) крави, независно од сезоната на телење, специфичната активност на GPx во млечниот серум во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација ($334,72 \pm 32,673$ mU/mg протеини) е повисока во споредба со периодот од 22. до 42. ден во лактација ($282,59 \pm 31,001$ mU/mg протеини). Спротивно, кај КМТ(+) крави, активноста на ензимот е пониска во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација, и тоа $304,15 \pm 32,896$ mU/mg протеини кај кравите со нарушена секреција на млечната жлезда и $360,83 \pm 46,331$ mU/mg протеини кравите со интрамамарна инфекција, во споредба со периодот од 22. до 42. ден во лактацијата, кога активноста на GPx во млечниот серум на кравите со нарушена секреција на млечната жлезда изнесуваше $354,96 \pm 43,719$ mU/mg протеини, а во млечниот серум на кравите со интрамамарна инфекција $472,36 \pm 78,940$ mU/mg протеини.

Генерално, активноста на GPx во млечниот серум беше поголема кај КМТ(+) крави во споредба со КМТ(-) крави.

Вкупно, за целата популација испитувани крави во првата календарска година, специфичната активност на GPx во млечниот серум изнесуваше $330,58 \pm 21,630$ mU/mg протеини во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата и $334,32 \pm 25,578$ mU/mg протеини во периодот од 22. до 42. ден во лактацијата.

Сликовито, специфичната активност на GPx во млечниот серум на кравите во првата година на истражување е дадена на Графикон 29.



Графикон 29. Специфична активност на GPx во млечниот серум во првата година на истражување, зависно од сезоната на телење и периодот на земање на пробата

Просечните вредности за специфичната активност на ензимот глутатион пероксидаза во млечниот серум на испитуваната популација млечни крави, во втората година на истражувањето, зависно од здравствениот статус на млечната жлезда, сезоната на телење и периодот на земање на пробата се прикажани во Табела 37.

Во текот на втората календарска година на истражување, во однос на периодот на земањето на пробите од млеко за испитување и независно од сезоната на телење, задржан е истиот тренд за активноста на ензимот GPx во млечниот серум на кравите како во првата година. Специфичната активност на GPx во млечниот серум на KMT(-) крави, неависно од сезоната на телење, во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација е повисока ($161,51 \pm 13,923$ mU/mg протеини) во споредба со периодот од 22. до 42. ден во лактација ($141,02 \pm 7,607$ mU/mg протеини). Спротивно, кај KMT(+) крави, активноста на ензимот е пониска во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација, и тоа $160,32 \pm 15,826$ mU/mg протеини кај кравите со нарушена секреција на млечната жлезда и $148,68 \pm 15,565$ mU/mg протеини кравите со интрамамарна инфекција, во споредба со периодот од 22. до 42. ден во лактацијата, кога активноста на GPx во млечниот серум на кравите

со нарушена секреција на млечната жлезда изнесуваше $165,61 \pm 20,207$ mU/mg протеини, а на кравите со интрамамарна инфекција $220,31 \pm 21,316$ mU/mg протеини.

Табела 37. Специфична активност на GPx во млечниот серум на кравите во втората година на истражување, зависно од сезоната на телење и периодот на земање на пробата (mU/mg протеини)

Сезона	Период	КМТ(-)		КМТ(+)				КМТ(-) + КМТ(+)	
		n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$	НС		ИМИ		n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$
				n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$	n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$		
113	21	16	130,13±12,518	11	176,36±26,050	8	172,49±36,711	35	154,34±13,127
	42		123,34±16,807		199,55±40,943		228,79±44,343		171,39±19,105
213	21	13	282,85±42,183	4	228,22±31,428	3	221,73±68,111	20	262,76±29,574
	42		156,47±15,381		165,44±22,701		320,61±20,447		182,88±17,228
313	21	24	116,33±5,574	6	123,18±20,709	9	123,90±12,514	39	119,13±5,310
	42		142,97±11,766		101,85±19,238		175,38±35,137		144,13±11,499
413	21	17	162,02±35,760	4	104,01±26,890	6	117,55±19,149	27	143,54±23,376
	42		143,10±18,201		168,08±22,757		226,23±38,595		165,27±15,639
2013	21	70	161,51±13,923	25	160,32±15,826	26	148,68±15,565	121	158,50±9,268
	42		141,02±7,607		165,61±20,207		220,31±21,316		163,14±8,043

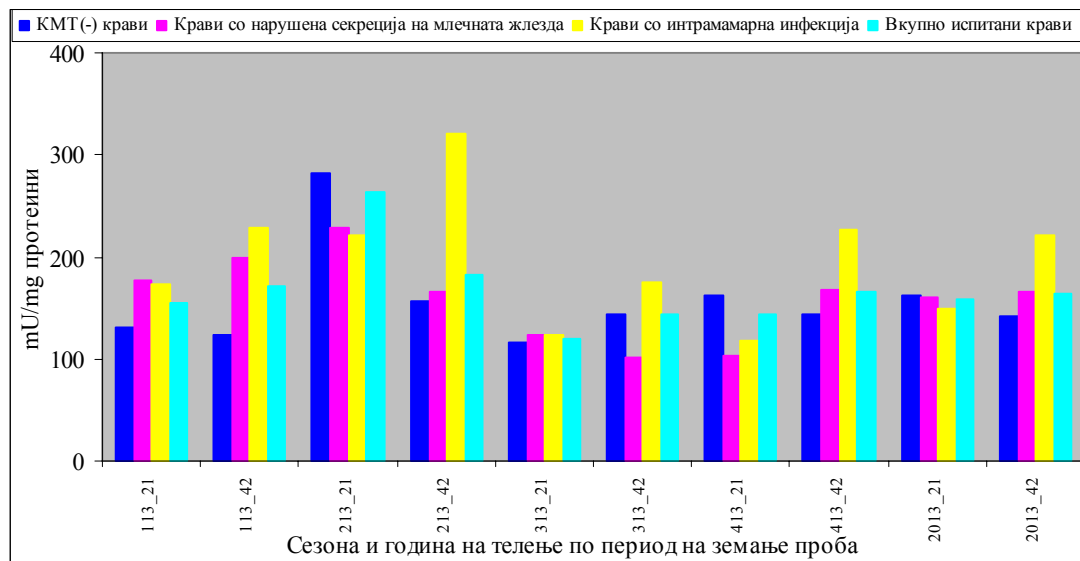
Меѓу двете години на истражување, постојат разлики во однос на тоа во која сезона се евидентирани највисоките и најниските активности на GPx во млечниот серум на кравите. Така, кај КМТ(-) крави во втората година на истражување, највисоката активност на GPx во млечниот серум, во двата периода на земањето на пробите од млеко, беше регистрирана во сезоната лето и изнесуваше од $156,47 \pm 15,381$ mU/mg протеини до $282,85 \pm 42,183$ mU/mg протеини. Најниската активност во оваа група крави во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација беше регистрирана во сезоната есен ($116,33 \pm 5,574$ mU/mg протеини), додека најниската активност во периодот од 22. до 42. ден беше регистрирана во сезоната пролет ($123,34 \pm 16,807$ mU/mg протеини).

Кај кравите со нарушена секреција на млечната жлезда, највисока активност на GPx во млечниот серум во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата беше регистрирана во сезоната лето ($228,22 \pm 31,428$ mU/mg протеини), а највисока активност во периодот од 22. до 42. ден во лактација во сезоната пролет ($199,55 \pm 40,943$ mU/mg протеини). Кај кравите со интрамамарна инфекција, највисока активност на GPx во млечниот серум, во двата периода на земање проба од млеко, беше регистрирана во сезоната лето, и тоа од $221,73 \pm 68,111$ mU/mg протеини до

320,61±20,447 mU/mg протеини. Кај двете групи на КМТ(+) крави најниска активност на GPx во млечниот серум во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација беше забележена во сезоната зима (104,01±26,890 mU/mg протеини до 117,55±19,149 mU/mg протеини), додека во периодот од 22. до 42. ден во лактација, најниска активност на GPx во млечниот серум беше регистрирана во сезоната есен (101,85±19,238 mU/mg протеини до 175,38±35,137 mU/mg протеини).

Вкупно, за целата популација испитувани крави во втората календарска година, активноста на GPx во млечниот серум, независно од здравствениот статус на млечната жлезда и сезоната на телење, изнесуваше 158,50±9,268 mU/mg протеини во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата и 163,14±8,043 mU/mg протеини во периодот од 22. до 42. ден во лактацијата.

Сликовито, специфичната активност на GPx во млечниот серум на кравите во втората година на истражување е дадена на Графикон 30.



Графикон 30. Специфична активност на GPx во млечниот серум во втората година на истражување, зависно од сезоната на телење и периодот на земање на пробата

Во Табела 38 збирно е прикажана специфичната активност на GPx во млечниот серум, зависно од периодот на земање на пробата за двете календарски години на истражување.

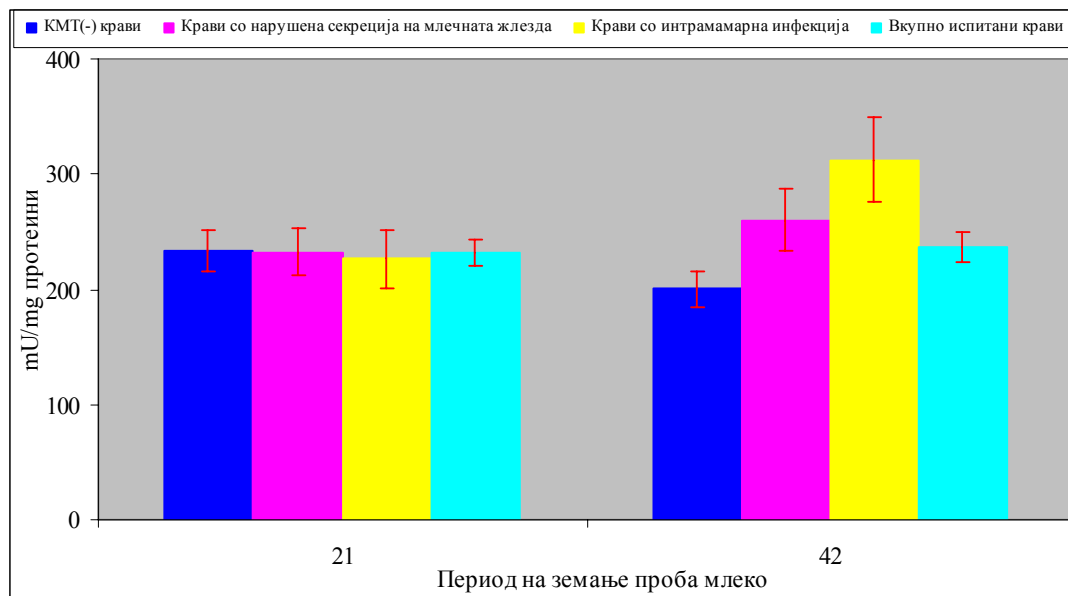
Табела 38. Специфична активност на GPx во млечниот серум на кравите зависно од периодот на земање на пробата (mU/mg протеини)

Примерок	Период	КМТ(-)		КМТ(+)				КМТ(-) + КМТ(+)	
		n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$	НС		ИМИ		n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$
				n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$	n	$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$		
Млечен серум	21	120	233,68±17,607	50	232,23±20,782	41	226,29±25,138	211	231,90±12,133
	42		200,00±15,013		260,28±27,404		312,52±36,694		236,16±13,175

Активноста на GPx во млечниот серум во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата, беше повисока кај КМТ(-) крави (233,68±17,607 mU/mg протеини) во споредба со активноста регистрирана кај двете групи КМТ(+) крави (226,29±25,138 mU/mg протеини кај кравите со нарушена секреција на млечната жлезда, до 232,23±20,782 mU/mg протеини кај кравите со интрамамарна инфекција). Меѓутоа, во периодот од 22. до 42. ден во лактацијата, активноста на GPx во млечниот серум на КМТ(-) крави беше пониска (200,00±15,013 mU/mg протеини) во споредба со активноста на ензимот кај КМТ(+) крави (260,28±27,404 mU/mg протеини кај кравите со нарушена секреција на млечната жлезда и 312,52±36,694 mU/mg протеини кај кравите со интрамамарна инфекција). Вкупно, независно од здравствениот статус на млечната жлезда, активноста на GPx во млечниот серум на кравите во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата изнесуваше 231,90±12,133 mU/mg протеини, и беше пониска во споредба со активноста во периодот од 22. до 42. ден во лактацијата (236,16±13,175 mU/mg протеини).

Активноста на GPx во млечниот серум на испитуваната популација млечни крави беше пониска во споредба со неговата активност во крвниот серум.

Сликовито, специфичната активност на GPx во млечниот серум на кравите за целиот период на истражување е дадена во Графикон 31.



Графикон 31. Специфична активност на GPx во млечниот серум за целиот период на истражување, зависно од периодот на земање на пробата

5.6. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА ЗА УТВРДУВАЊЕ НА ПОВРЗАНОСТА ПОМЕЃУ МАСТИТОТ И ОКСИДАТИВНИОТ СТРЕС КАЈ МЛЕЧНИ КРАВИ

Во Табела 39 се прикажани резултатите од Моделот 1 за влијанието на фиксните фактори на специфичната активност на SOD во крвниот серум на кравите.

Табела 39. Влијание на факторите на специфичната активност на SOD во крвниот серум на кравите

Зависна променлива: специфична активност на SOD во крвен серум			
Фактори	Степени на слобода	Варијанса	F-вредност
Општ просек	1	461,415	133,764***
YS C	7	211,041	15,506***
L	4	202,709	1,171 ^{NS}
M	2	614,183	1,498 ^{NS}
T	2	436,611	17,819***

***статистички значајно на ниво $p < 0,001$

^{NS}несигнификантно

Статистичка значајност на ниво $p < 0,001$ покажаа влијанието на сезоната на телење во годините на истражување и периодите пред и по телење кога се земани примероците крв. Лактацијата по ред на кравите и здравствените нарушувања на млечната жлезда не покажаа статистички значајно влијание врз активноста на SOD во крвниот серум на испитуваните крави.

Тестирањето на разликите меѓу средните вредности на специфичната активност на SOD во крвниот серум на кравите во однос на сезоните во годините на телење кога се направени истражувањата е прикажано во Табела 40.

Табела 40. Тестирање на разликите на средните вредности на специфичната активност на SOD во крвен серум меѓу сезоните во годините на телење

Сезона	212	312	412	113	213	313	413
112	2,156	37,311*	18,406	19,891*	6,318	11,176	14,892
212		35,254*	20,563	17,734	8,474	13,333	17,048
312			55,717*	17,421	43,628*	48,487*	52,202*
412				38,296*	12,089	7,230	3,515
113					26,207*	31,066*	34,782*
213						4,859	8,574
313							3,715

* статистичка значајна разлика на ниво $p < 0,05$

Најголема статистички значајна разлика во специфичната активност на ензимот SOD во крвниот серум на кравите постоеше меѓу сезоната есен во првата година и останатите сезони во текот на двогодишниот период на истражување, со исклучок на сезоната пролет во втората година на истражување. Исто така, голема статистички значајна разлика во специфичната активност на SOD во крвниот серум постоеше меѓу сезоната пролет во втората година на истражување и сезоните пролет и зима во првата година, како и меѓу сезоната пролет во втората година и сезоните лето, есен и зима во втората година на истражување.

Тестирањето на разликите меѓу средните вредности на специфичната активност на SOD во крвниот серум на кравите во однос на периодите кога се земани примероците од крв е прикажано во Табела 41.

Табела 41. Тестирање на разликите на средните вредности на специфичната активност на SOD во крвен серум меѓу периодите на земање примерок крв

Период на земање на примероците	21	42
-21	21,062*	3,753
21		17,310*

* статистичка значајна разлика на ниво $p < 0,05$

Постоеше статистички значајна разлика во средните вредности на специфичната активност на SOD во крвниот серум на кравите во периодот 21. ден пред телење и периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација, како и меѓу периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација и периодот од 22. до 42. ден во лактација.

Во Табела 42 се прикажани резултатите од Моделот 2 за влијанието на фиксните фактори на активноста на SOD во млечниот серум на кравите. Единствено, сезоната на телење во годините кога се направени истражувањата покажа статистички значајно влијание на активноста на SOD во млечниот серум на кравите, на ниво $p < 0,001$, додека влијанието на здравствениот статус на млечната жлезда се приближуваше до статистичка значајност на ниво $p < 0,05$ ($p = 0,058$). Останатите испитувани фактори не покажаа статистичка значајно влијание на активноста на SOD во млечниот серум на испитуваните крави.

Табела 42. Влијание на факторите на специфичната активност на SOD во млечниот серум на кравите

Зависна променлива: специфична активност на SOD во млечен серум			
Фактори	Степени на слобода	Варијанса	F-вредност
Општ просек	1	257,263	8,739**
YS C	7	152,123	16,124***
L	4	146,025	1,037 ^{NS}
M	2	277,589	2,874*
T	1	146,435	0,130 ^{NS}
TDM	1	260,329	0,690 ^{NS}

***статистички значајно на ниво $p < 0,001$

**статистички значајно на ниво $p < 0,01$

*статистички значајно на ниво $p = 0,05$

^{NS} несигнификантно

Тестирањето на разликите меѓу средните вредности на специфичната активност на SOD во млечниот серум на кравите, во однос на сезоните во годините на телење кога се направени истражувањата е прикажано во Табела 43.

Табела 43. Тестирање на разликите на средните вредности на специфичната активност на SOD во млечен серум меѓу сезоните во годините на телење

Сезона	212	312	412	113	213	313	413
112	18,137	20,167	36,535	11,101	121,745*	137,899*	64,663
212		2,030	18,398	7,036	139,882*	156,035*	82,800
312			16,369	9,065	141,912*	158,065*	84,830
412				25,434	158,281*	174,434*	101,199*
113					132,847*	149,000*	75,765*
213						16,153	57,082
313							73,235*

* статистичка значајна разлика на ниво $p < 0,05$

Забележителна беше големата статистички значајна разлика во специфичната активност на ензимот SOD во млечниот серум меѓу сезоните лето и есен во втората година на истражување и останатите сезони во текот на истражувањето. Исто така, постоеше голема статистички значајна разлика во специфичната активност на ензимот SOD во млечниот серум меѓу сезоната зима втората година и сезоната зима во првата година на истражување.

Во Табела 44 се прикажани резултатите од Моделот 3 за влијанието на фиксните фактори на специфичната активност на GPx во крвниот серум на кравите, при што, статистичка значајност на ниво $p < 0,001$ покажаа влијанието на сезоните во

годините на телење, здравствените нарушувања на млечната жлезда, периодите пред и по телење кога се земани примероците од крв и активноста на SOD во крвниот серум на кравите. Лактацијата по ред на кравите не покажа статистички значајно влијание на специфичната активност на GPx во крвниот серум на кравите.

Табела 44. Влијанието на факторите на специфичната активност на GPx во крвниот серум на кравите

Зависна променлива: специфична активност на GPx во крвен серум			
Фактори	Степени на слобода	Варијанса	F-вредност
Општ просек	1	513,219	1052,899 ***
YS_C	7	230,104	99,292 ***
L	4	216,240	0,629 ^{NS}
M	2	618,071	7,799***
T	2	443,627	38,802 ***
SOD_крв	1	596,058	28,590***

***статистички значајно на ниво $p < 0,001$

^{NS}несигнификантно

Тестирањето на разликите меѓу средните вредности на специфичната активност на GPx во крвниот серум на кравите во однос на сезоните во годините на телење е прикажано во Табела 45.

Табела 45. Тестирање на разликите на средните вредности на специфичната активност на GPx во крвниот серум на кравите меѓу сезоните во годините на телење

Сезона	212	312	412	113	213	313	413
112	504,249*	16,605	332,153*	58,436	230,750*	64,413	150,556*
212		487,643*	172,095*	445,182*	273,498*	439,836*	353,693*
312			315,548*	41,831	214,145*	47,807	133,950*
412				273,717*	101,403*	267,740*	181,598*
113					172,314*	5,976	92,119*
213						166,338*	80,195
313							86,143*

* статистичка значајна разлика на ниво $p < 0,05$

Забележителна беше статистички значајна разлика во специфичната активност на GPx во крвниот серум меѓу сите сезони во годините на телење, со некои исклучоци, како меѓу сезоната пролет во првата година и сезоните есен во првата година и пролет и есен во втората година на истражување, како и сезоната есен во првата година и сезоните пролет и есен во втората година на истражување.

Исто така, не постоеше статистички значајна разлика во специфичната активност на GPx во крвниот серум меѓу сезоните лето и зима во втората година на телење.

Тестирањето на разликите меѓу средните вредности на специфичната активност на GPx во крвниот серум на кравите во однос на здравствениот статус на млечната жлезда е прикажано во Табела 46.

Табела 46. Тестирање на разликите на средните вредности на специфичната активност на GPx во крвниот серум на кравите зависно од здравствениот статус на млечната жлезда

Здравствен статус на млечна жлезда	НС	ИМИ
КМТ(-)	6,987	70,745*
НС		77,732*

* статистичка значајна разлика на ниво $p < 0,05$

Во однос на групите на крави со различен здравствен статус на млечната жлезда, постоеше статистички значајна разлика во средните вредности на специфичната активност на GPx во крвниот серум меѓу групата крави со интрамамарна инфекција и групата КМТ(-) крави и кравите со нарушена секреција на млечната жлезда.

Тестирањето на разликите меѓу средните вредности на специфичната активност на GPx во крвниот серум на кравите во однос на периодите кога се земани примероците од крв е прикажано во Табела 47.

Табела 47. Тестирање на разликите на средните вредности на специфичната активност на GPx во крвен серум меѓу периодите на земање примерок крв

Период на земање на примероците	21	42
-21	100,645*	57,506*
21		43,139*

* статистичка значајна разлика на ниво $p < 0,05$

Постоеше статистички значајна разлика во средните вредности на специфичната активност на GPx во крвниот серум на кравите меѓу сите периоди кога се земани примероците од крв, но таа беше најголема меѓу периодот пред телење и периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактација.

Во Табела 48 се прикажани резултатите од Моделот 2 за влијанието на фиксните фактори на активноста на GPx во млечниот серум на кравите.

Табела 48. Влијание на факторите на специфичната активност на GPx во млечниот серум на кравите

Зависна променлива: специфична активност на GPx во млечен серум			
Фактори	Степени на слобода	Варијанса	F-вредност
Општ просек	1	248,031	156,773***
YS_C	7	164,790	83,596***
L	4	158,292	1,182 ^{NS}
M	2	269,747	3,061*
T	1	161,247	1,730 ^{NS}
TDM	1	247,976	4,590*

***статистички значајно на ниво $p < 0,001$

*статистички значајно на ниво $p < 0,05$

^{NS}несигнификантно

Во моделот, статистичка значајност на ниво $p < 0,001$ покажа влијанието на сезоните во годината на телење. Здравствените нарушувања на млечната жлезда и млечноста на кравите во тест денот при месечните контроли на млеко покажаа статистичка значајност на ниво $p < 0,05$. Периодот во лактација кога се земани примероците од млеко и лактацијата по ред на кравите не покажаа статистички значајно влијание на специфичната активност на GPx во млечниот серум.

Тестирањето на разликите меѓу средните вредности на специфичната активност на GPx во млечниот серум на кравите во однос на сезоните во годините на телење е прикажано во Табела 49.

Табела 49. Тестирање на разликите на средните вредности на специфичната активност на GPx во млечниот серум на кравите меѓу сезоните во годините на телење

Сезона	212	312	412	113	213	313	413
112	527,869*	112,907*	267,192*	57,818	146,414*	25,195	66,344
212		414,962*	260,677*	470,050*	381,455*	502,673*	461,525*
312			154,285*	55,089	33,507	87,711*	46,563
412				209,374*	120,778*	241,996*	200,848*
113					88,595*	32,623	8,526
213						121,218*	80,070
313							41,148

* статистичка значајна разлика на ниво $p < 0,05$

Забележителна беше статистички значајна разлика во специфичната активност на GPx во млечниот серум меѓу повеќе сезони на телење, но со некои исклучоци. Така, постоеше статистички значајна разлика во специфичната активност на GPx во млечниот серум меѓу сезоните лето и зима во првата година и сите останати сезони во годините на телење. Исто така, постоеше статистички значајна разлика и меѓу сезоните лето и есен во втората година и останатите сезони во годините на телење.

Тестирањето на разликите меѓу средните вредности на специфичната активност на GPx во млечниот серум на кравите во однос на здравствениот статус на млечната жлезда е прикажано во Табела 50.

Табела 50. Тестирање на разликите на средните вредности на специфичната активност на GPx во млечен серум меѓу групите на крави со различен здравствен статус на млечната жлезда

Здравствен статус на млечна жлезда	НС	ИМИ
КМТ(-)	10,295	42,869*
НС		32,574

* статистичка значајна разлика на ниво $p < 0,05$

Во однос на групите на крави со различен здравствен статус на млечната жлезда, постоеше статистички значајна разлика во средните вредности на специфичната активност на GPx во млечниот серум помеѓу групата КМТ(-) крави и кравите со интрамамарна инфекција.

Утврдувањето на меѓусебната зависност на специфичната активност на SOD и GPx во крвниот и млечниот серум на кравите беше проверена преку Пирсоновиот коефициент на корелација. Вредностите на Пирсоновиот коефициент на корелација и нивната статистичка значајност се прикажани во Табела 51.

Табела 51. Пирсонов коефициент на корелација за специфичната активност на SOD и GPx во крвниот и млечниот серум на кравите

Pearson's	GPx_млеко	SOD_крв	SOD_млеко
GPx_крв	0,614**	0,141*	0,089
GPx_млеко	1	0,018	0,172*
SOD_крв		1	0,110*

**статистички значајно на ниво $p < 0,01$

* статистички значајно на ниво $p < 0,05$

Забележително беше дека постои висока, статистички значајна поврзаност помеѓу специфичната активност на GPx во крвниот серум и специфичната активност на GPx во млечниот серум на кравите. Исто така, постоеше статистички значајна поврзаност меѓу специфичната активност на SOD во крвниот серум и SOD во млечниот серум на кравите. Во однос на активноста на двата ензима, постоеше мала но статистички значајна корелација меѓу активноста на GPx во крвниот серум и SOD во крвниот серум на кравите и меѓу активноста на GPx во млечниот серум и SOD во млечниот серум на кравите.

6. ДИСКУСИЈА

Цел на истражувањата во оваа проспективна студија беше да се утврди поврзаноста на оксидативниот стрес со појавата на мастит во стадо млечни крави преку испитување на активноста на ензимите супероксид дисмутаза (SOD) и глутатион пероксидаза (GPx).

Метаболичката адаптација на негативниот енергетски баланс во постпарталниот период резултира со зголемена продукција на реактивни оксидативни метаболити и појава на оксидативен стрес (Contreras и Sordillo, 2011).

Улогата на оксидативниот стрес во настанувањето на имunosупресијата и зголемената инциденција на мастит во стадата млечни крави била широко дискутирана во повеќе научни истражувања (LeBlanc, 2008; Spears и Weiss, 2008; Sordillo и Aitken, 2009).

Метаболичките промени кои настануваат во организмот на млечните крави во периодот непосредно по телењето и раната лактација, меѓу кои и оксидативниот стрес, предизвикуваат нарушување на општата благосостојбата на кравите. Понатаму, нарушената благосостојба се манифестира со нарушување на репродуктивните перформанси на стадото, зголемување на инциденцијата на болестите, намалување на должината на експлоатација на животните и зголемување на морбидитетот и морталитетот.

Castillo (2006), истражувајќи го периодот на рана лактација од аспект на појавата на оксидативен стрес, дефинирал два периода во кои настануваат најголемите метаболички промени од аспект на мобилизација на мастите, и тоа: периодот од 3 недели во лактација и вториот, период кој следи сè до постигнување на највисоката млечност во лактацијата.

Оксидативниот стрес претставува релативно ново поле на истражување во ветеринарната медицина, а особено неговата поврзаност со здравјето на преживните животни (Celi, 2011a). Постојат многу директни и индиректни методи за одредување на оксидативните соединенија и антиоксидансите. Овие методи, со помали или поголеми недостатоци, овозможуваат квантификација на состојбите на оксидативниот стрес во организмот на животните (Celi, 2011b). Повеќе научни приоди овозможуваат евалуација на состојбите на оксидативниот стрес во живиот организам, и тоа преку: мерење на оксидативниот или редуктивниот потенцијал на

плазмата или серумот, мерење на способноста на примерокот да се оксидира или преку детерминирање на продуктите од оксидацијата (Dotan и сop., 2004; Lykkesfeldt и Svendsen, 2007; Kankofer и сop., 2010a). Argqelles и сop. (2004), во нивните истражувања, користејќи индикативни серумски биомаркери на оксидативен стрес се обиделе да го предвидат оксидативното оштетување на ткивата. Од сите биомаркери, според Vernabucci и сop. (2002), супероксид дисмутазата и глутатион пероксидазата се најрелевантни и најчесто користени антиоксидативни ензими како индикатори за откривање на оксидативниот стрес.

Антиоксидативните ензими се првата и најбрза одбранбена реакција на настанатите состојби на нарушен редокс-статус. Ова беше една од причините истражувањата за квантификација на оксидативниот стрес во организмот на кравите во преодниот период од гестација кон лактација и неговата поврзаност со маститот да бидат базирани врз одредувањето на активноста на двата најважни антиоксидативни ензима, супероксид дисмутазата и глутатион пероксидазата.

Други трендови во истражувањата поврзани со антиоксидансите и оксидативниот стрес вклучуваат развивање на методи за мерење на антиоксидативниот капацитет во различни биолошки медиуми. Како алтернатива на одредувањето на активноста на антиоксидативните ензими, некои автори за квантификација на оксидативниот статус го користеле одредувањето на вкупниот антиоксидативен капацитет на плазмата и вкупната концентрација на слободни радикали во крвта (Mandevu и сop., 2003). Квантификацијата на индикаторите за откривање на оксидативниот стрес даваат слика за целокупната одбранбена состојба на организмот и неговата приемливост кон многу заболувања. На крајот, сите овие истражувања се стремат кон одредување на оксидативниот индекс, односно соодносот на оксидансите и антиоксидансите како најрелевантен параметар за квантификација на оксидативниот стрес во живиот организам, за што се неопходни идни истражувања.

Според достапните литературни податоци за Република Македонија, истражувањата направени во овој труд се први што ги интегрираат ензимските антиоксидативни механизми во организмот на млечните крави и ризикот за појава на нарушена секреција на млечната жлезда и интрамамарни инфекции.

Според Vernabucci и сop. (2005) и Castillo и сop. (2006), зголеменото присуство на липидни пероксиди во крвта и пониското ниво на аскорбати се

индикација дека маститот кај млечните крави предизвикува оксидативен стрес. Една од целите на ова истражување беше да се дизајнира статистички модел кој би можел да се користи за рано откривање на маститот во стадата млечни крави врз основа на користењето на биомаркери. Ова би овозможило преземање на соодветни менаџментски мерки на фармите за млечни крави за намалување на негативниот ефект на маститот и поголем успех во терапијата. Слични цели во своите истражувања имале и други автори. Така, Chagunda и сор. (2006) се обиделе преку модел базиран врз активноста на ензимот L-лактат дехидрогеназа (LDH) во млекото, како индикатор за откривање на мастит, да ја предвидат појавата на ова заболување во стадо млечни крави. Меѓутоа, моделот што тие го испитувале бил со ограничена сензитивност и специфичност. Авторите de Mol и Ouweltjes (2001) дизајнирале статистички модели за да го предвидат ризикот за појава на мастит, при што успеале да откријат 42-44 случаи на мастит од 48 случаи.

Направените истражувања во оваа област имаат одредени слабости и ограничувања. Генерално, студиите кои се поврзани со теренски истражувања често имаат одредени недостатоци. Теренските истражувања, во кои како цел се поставени здравствените нарушувања на млечната жлезда, секогаш се проследени со потешкотии во навременото дијагностицирање на маститот и точното дефинирање на формата на ова заболување. Ова особено се однесува на периодот на рана лактација.

Во однос на патогенезата, маститот претставува воспалителен процес кој има свој тек, за што е потребно одредено време за манифестирање на знаците на болеста. Затоа, од научна гледна точка, постоеше различно долг временски интервал од моментот кога реално започнуваат да се развиваат воспалителните процеси во млечната жлезда до моментот на дијагностицирање на маститот, како и моментот кога се земани примероците од крв и од млеко за одредување на биолошките маркери на оксидативен стрес. Временското неусогласување од моментот кога реално започнале воспалителните процеси во млечната жлезда, на кои нормално и физиолошки организмот на кравите соодветно реагира, до моментот кога се земани примероците од крв и од млеко за биохемиска анализа, може да бидат причина за појава на сомневање при толкувањето на резултатите. Заради отстранување на недостатоците кои можат да влијаат врз текот на ваквите истражувања, Bartlett и сор. (1986) препорачуваат постојано присуство на стручно лице во фармата. Тоа лице ќе

има задача секојдневно да ги следи опитните животни и при тоа, за сите констатирани промени да води точна евиденција.

Оценката на оксидативниот стрес и неговата поврзаност со здравствените нарушувања на млечната жлезда во ова истражување се базираат врз направените испитувања на одредени биолошки маркери на оксидативен стрес, како што се маркерите за ензимскиот антиоксидативен статус. Споредувањето на апсолутната активност на антиоксидативните ензими со литературните резултати, добиена во други истражувања, често може да доведе до извлекување на различни заклучоци. Причина за ова е фактот што активноста на овие ензими е тесно поврзана со минералниот статус на организмот на животните. Микроелементите се важен активен дел на ензимите. Нивната концентрација е тесно поврзана со условите во околината, исхраната и физиолошкиот статус на животните (Bernabucci и sor., 2002; 2005). Сепак, значењето на ова студија е големо, затоа што ова се први истражувања во оваа област направени во Република Македонија.

За реализација на истражувањата вкупно беа вклучени 211 високомлечни крави од црно-белата раса, селектирани во периодот пред телење и периодот на рана лактација. Кравите беа сместени во фарма со слободен систем на чување. Резултатите кои се добиени во овие истражувања не мора да се однесуваат и на појавата на оксидативен стрес и мастит во стадата со нископродуктивните млечни крави, а кои се застапени во не така мал број во Република Македонија. При формирање на групите на крави, влијанието на условите од околината беше сведено на минимум бидејќи сите млечни крави беа сместени во идентични услови на одгледување. Кравите кои ги формираа групите се отелувани во период од 7 до 10 дена. Ова беше направено со цел влијанието на физиолошките и надворешните фактори да биде соодветно. На тој начин, добиените резултати од статистичките модели може да дадат пореална слика за поврзаноста меѓу антиоксидативните показатели на оксидативниот стрес и маститот. Кравите вклучени во истражувањето беа од прва до петта и поголема лактација Сите крави кај кои во текот на периодот на опсервација беше утврдено постоење на друго здравствено нарушување, освен мастит, беа отстранувани од групите. На овој начин се исклучуваше влијанието на останатите здравствени нарушувања врз ензимскиот антиоксидативен статус на животните. Сепак, мора да се напомене дека при откривањето на кравите со здравствени нарушувања на млечната жлезда, постоеше мала субјективност.

Толкувањето на резултатите од калифорнија маститис тестот (КМТ) се правеше според упатството на производителот. Откривањето на интрамамарните инфекции и идентификацијата на причинителите на мастит беше направено согласно стандардните микробиолошки протоколи.

Со ваквиот дизајн на истражување се придонесе за намалување на субјективноста, што од друга страна значеше добивање пореални резултати при отсликувањето на состојбата со преваленцијата на здравствените нарушувања на млечната жлезда кај кравите во рана лактација и воведувањето на организмот во состојба на оксидативен стрес.

Добиените резултати укажуваат на статистички значајно влијание на сезоната во годината на телење, здравствените нарушувања на млечната жлезда, периодите пред и по телење кога се земани примероците од крв и од млеко врз специфичната активност на антиоксидативните ензими SOD и GPx во крвниот и млечниот серум на кравите. Возраста на кравите односно лактацијата по ред и млечноста статистички немаа значајно влијание врз појавата на состојбите на оксидативен стрес во организмот на млечните крави во преодниот период од гестација кон рана лактација. Групата формирана од крави во лактација кои во текот на обсервираниот период заболела од случај на мастит, имаше повисока просечна млечност во тест денот при првата контрола на млеко во споредба со здравата, контролна група крави, но подоцна при втората и третата контрола на млеко во тест денот се забележуваше тренд на континуирано опаѓање на млечноста, при што просечната млечност на кравите заболени од мастит значително опаѓаше во споредба со просечната млечност на кравите во здравата, контролна група.

6.1. ЕВАЛУАЦИЈА НА КАЛИФОРНИЈА МАСТИТИС ТЕСТОТ

Навременото дијагностицирање и сузбивање на интрамамарните инфекции во периодот на рана лактација има значаен економски импакт, кој се огледа во намалување на количествата на здравствено неисправното млеко и редуцирање на бројот на соматските клетки во збирното млеко (Wallace и сор., 2002).

Генерално, може да се каже дека идеална алатка за точна и брза дијагностика на инфицираните четвртинки на млечната жлезда не постои. Културелните испитувања претставуваат „златен“ стандарден метод за откривање на кравите со инфекција на млечната жлезда, но се неекономични и недостапни во фармски услови (Sargeant и сор., 2001).

Одредувањето на вкупниот број на соматски клетки во кравјото млеко е широко прифатен метод за рано откривање на инфекциите на млечната жлезда и евалуација на квалитетот на млекото (Pyorala, 2003). Меѓутоа, мора да се има предвид дека самиот период од лактацијата влијае врз вкупниот број на соматски клетки во млекото. Возраста на кравите, фреквенцијата на молзење и продукцијата на млеко, исто така, влијаат врз бројот на соматски клетки во млекото (Hand и сор., 2012). Според други истражувања, физиолошките промени во организмот многу малку влијаат врз бројот на соматски клетки во млекото на здравите крави (Charfeddine и сор., 1997).

За разлика од класичните културелни испитувања и одредувањето на бројот на соматските клетки во млекото, теренските дијагностички методи за откривање на маститот се лесно применливи на фарма, брзи и ефтини. Истовремено даваат првична идникација за отпочнување со антибиотска терапија, особено во периодот пред засушување на кравите и периодот на рана лактација. Најчесто употребувани теренски тестови за откривање на интрамамарните инфекции на фармите за млечни крави се калифорнија маститис тестот (КМТ), одредувањето на кондуктивитетот на млекото и одредувањето на присуството на хлориди и натриум во млекото (Sharma и сор., 2011; Hegde, 2013).

Досега се направени повеќе истражувања со цел евалуација на брзите теренски тестови за откривање на интрамамарните инфекции кај млечните крави (Roy и сор., 2009). Стандардниот културелен метод претставува основа за евалуација на брзите теренски методи за откривање на маститот. Сепак, според Bradley и сор.

(2005) понекогаш „златниот стандард“ може да биде неефикасен во оцената на брзите скрининг-тестови за рано откривање на кравите со интрамамарна инфекција.

Сензитивноста и специфичноста се карактеристики на секој тест. Тие овозможуваат негово споредување со друг дијагностички тест, но сепак, не претставуваат вистинска рефлексивност на здравствениот статус на животното (Greiner и Gardner, 2000).

Податоците за сензитивноста и специфичноста на КМТ во литературата меѓу себе многу се разликуваат. Larsen, (2000) користејќи го како гранична вредност бројот од 200 000 соматски клетки во ml млеко и со помош на културелни испитувања, утврдил дека сензитивноста на КМТ за мониторинг на маститот во стадата млечни крави се движи од 73% до 89% со специфичност на тестот од 75% до 85%. Dingwell и сор. (2003), ги истакнуваат недостатоците на КМТ во однос на неговото отстапување од идеалната сензитивност и специфичност, што го прават ограничен во откривањето на кравите со интрамамарни инфекции. Меѓутоа, позитивната реакција на КМТ не секогаш е поврзана со изолација на одреден патоген микроорганизам кој предизвикува мастит. Како најчеста причина за тоа се наведува недостатокот на микробиолошките методи (Sears и сор., 1990). Исто така, присуството на патогените микроорганизми кои предизвикуваат мастит не секогаш е проследено со зголемување на бројот на соматски клетки во млекото, што најчесто е резултат на неспецифичниот тек на инфекцијата, постоењето на тивка инфекција со слаб прогрес, слаба акутна фаза на воспалителната реакција или пак акутна фаза на инфекцијата со краток тек (Dopfer и сор., 1999). Middleton и сор. (2004) заклучиле дека КМТ претставува рапиден, практичен и ефтин тест за индиректно детерминирање на вкупниот број на соматски клетки во млекото во фармски услови и претставува показател за можно присуство на интрамамарни инфекции. Овие автори го квалификувале КМТ како тест со ниска сензитивност, но висока специфичност. Sanford и сор. (2006) КМТ го оцениле со висока сензитивност, но ниска специфичност, додека според Sargeant и сор. (2001), КМТ е тест со ниска сензитивност и специфичност.

Сензитивноста на КМТ, во нашите истражувања, во рана лактација изнесуваше 43,82%. Според добиените резултати во првата година на истражување кај 37,50% од КМТ(+) крави беше утврдено постоење на интрамамарна инфекција, а во втората година кај 50,98%. За целиот период на истражување, интрамамарна

инфекција беше утврдена кај 45,05% од КМТ(+) крави. Преваленцијата на крави со интрамамарна инфекција во однос на КМТ(+) крави беше пониска во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата, и изнесуваше 40,68%, во однос на периодот од 22. до 42. ден во лактацијата (48,28%). Во текот на двегодишниот период на истражување, преваленцијата на четвртинките на млечната жлезда со инфекција во однос на четвртинките со КМТ(+) реакција беше незначително пониска во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата (43,04%) во однос на периодот од 22. до 42. ден во лактацијата (44,58%).

Споредувајќи ги нашите резултати со литературните, може да се констатира дека некои автори утврдиле многу повисок процент на инфицирани четвртинки од четвртинките со КМТ(+) реакција (Trinidad и сор., 1990; Heleili и сор., 2012). Во прилог на ова одат и истражувањата на Saidi (2013) кој укажува на висока корелација меѓу резултатот од КМТ и културелните микробиолошки испитувања за утврдување на интрамамарни инфекции кај кравите.

Преваленцијата на инфицирани четвртинки на млечната жлезда во истражувањето на Dingwell и сор. (2003) изнесувала 10,00%, при што сензитивноста, специфичноста, позитивната предиктивна и негативната предиктивна вредност на КМТ изнесувале 68,8%, 71,5%, 21,1%, односно 95,4%.

Vachaya и сор. (2011) истакнуваат дека позитивната реакција на КМТ коренспондира со зголемувањето на вкупниот број на соматски клетки во млекото, но сè уште не може со сигурност да се каже дали интензитетот на реакцијата може да даде рефлексија за специфичен патоген причинител на мастит. Kivaria и сор. (2004) утврдиле дека средно позитивната реакција на КМТ е поврзана со зголемување на ризикот за појава на интрамамарни инфекции предизвикани од *Staphylococcus aureus*. Сензитивноста и специфичноста на КМТ била подобра кога инфекциите биле предизвикани од главните патогени микроорганизми кои предизвикуваат мастит (Sargeant и сор., 2001). Според Roy и сор. (2009), во периодот пред телење, јуниците со негативен КМТ и електричен кондуктивитет помал од 6 mS/cm, имаат висока веројатност од 94% односно 86% да не бидат инфицирани со некој од главните патогени причинители на мастит.

Негативниот бактериолошки резултат во примероците од млеко кои покажале КМТ(+) реакција може да е резултат на специфичниот раст на одредени бактериски видови за кои се потребни специјални хранливи положоги (Ranjan и сор., 2010) или пак

растот на колониите да е инхибиран од присуството на антибиотски резидуи (Sears и сор., 1990).

Poutrel и Rainard (1981) истакнуваат дека со помош на КМТ може да се откријат 80% од случаите на интрамамарна инфекција во периодот пред засушување. Меѓутоа, тестот имал послаба предиктивна моќ во периодот на рана лактација. Спротивно на овие сознанија, Dingwell и сор. (2003) изнесуваат податок за висока сензитивност (82,4%) и специфичност (80,6%) на КМТ во периодот од почетокот на лактацијата до 4. ден во лактацијата. И други автори истакнуваат дека КМТ може оптимално да се користи за откривање на инфицираните четвртинки на млечната жлезда во првиот месец во лактацијата (Sargeant и сор., 2001), и тоа со сензитивност од 71% и специфичност од 75%. Sanford и сор. (2006) препорачуваат редовно да се практикува КМТ на денот на засушување бидејќи имал висока негативна предиктивна вредност за интрамамарните инфекции предизвикани од главните патогени причинители на мастит. Позитивната предиктивна вредност на КМТ била повисока во стада со висока преваленција на интрамамарни инфекции во периодот пред телење (Roy и сор., 2009). Според Owens и сор. (1991), недостаток на КМТ е што не може да се примени во колостралното млеко.

Важен заклучок на повеќе автори, кои како цел на истражување ја имале евалуацијата на КМТ, било големото влијание на оспособеноста на стручните лица кои ја читаат реакцијата на тестот врз неговите перформанси. Имено, перформансите на КМТ многу се разликувале во истражувањата направени на експериментални фарми, кога реакцијата била читана од обучени лица, и комерцијални фарми кога читањето на истата го вршеле неквалификувани работници (Wallace и сор., 2002). Комбинацијата на брзите скрининг-тестови заедно со микробиолошките испитувања, претставува најрелевантен индикатор за откривање на интрамамарните инфекции.

6.2. ПРЕВАЛЕНЦИЈА НА ПАТОГЕНИТЕ ПРИЧИНТЕЛИ НА МАСТИТ

Во текот на целиот двегодишен период на истражување, вкупно беа утврдени 162 четвртинки на млечната жлезда со КМТ(+) реакција, од кои 56,17% беа со нарушена секреција. Микробиолошки позитивни беа 43,83%, од кои во 19,14% од случаите беше изолиран *Streptococcus agalactiae*, во 8,02% *Enterococcus spp.*, во 6,79% *Candida non-albicans*, во 6,17% *Staphylococcus aureus*, во 1,85% *Escherichia coli*, во 1,23% *Aspergillus niger* и во еден случај беше изолиран *Pseudomonas aeruginosa* (0,62%).

Како можни причини за појава на бактериолошки негативни резултати се: присуство на патогени микроорганизми во пробите млеко под границата за детекција при нивното култивирање и користење на несоодветни хранливи подлоги за култивирање на бактериите (Ranjana и сар., 2010). Според други истражувања микробиолошки негативен наод бил присутен кај 17,7-26,5% од случаите на клинички мастит и 28,7-38,6% од случаите на супклинички мастит (Bradley и сар., 2007; Roesch и сар., 2007).

Во истражувањата на Ramirez и сар. (2014), 30,4% од културите на млеко земени од четвртинките на млечната жлезда со нарушена секреција биле микробиолошки негативни. Исто така, постои можност дека некои од четвртинките на млечната жлезда кои покажале негативна реакција на КМТ да биле инфицирани со коагулаза негативни стафилококи или други патогени микроорганизми, кои за разлика од главните патогени причинители на мастит се помалку превалентни во стадата млечни крави и не предизвикуваат драстично зголемување на бројот на соматски клетки во млекото (Calderon и Rodrigues, 2008).

Бројни литературни податоци изнесуваат заклучоци дека појавата на интраматарни инфекции во периодот на рана лактација најверојатно е резултат на постоење инфекција на млечната жлезда во сувостојниот период (Radostits и сар., 2007).

Во повеќето истражувања, најчесто изолирани патогени микроорганизми во случаите на супклинички мастит кај млечните крави биле стафилококите и стрептококите (Bradley и сар., 2007; Roesch и сар., 2007; Kalmus и сар., 2011). Според Saini и сар. (2013), во стадата високомлечни крави, маститот предизвикан од патогени микроорганизми од околината, меѓу кои и *Escherichia coli*, најчесто се

појавува во рана лактација. Главните патогени причинители на мастит се најпревалентни во случаите на нарушена секреција на млечната жлезда (Miltenburg и сор., 1996).

Во истражувањата на Saidi (2013), најпревалентен патоген причинител на мастит бил *Staphylococcus aureus*, кој учествувал со 40% од вкупно изолираните микроорганизми. Следен по зачестеност бил *Streptococcus spp.* со 12%. Слични податоци изнесуваат и авторите од други земји (Heleili и сор., 2012). Во истражувањата на Dingwell и сор. (2003) доминантни патогени микроорганизми изолирани во рана лактација биле *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.* од околината и *Escherichia coli*. Пропорционалниот сооднос на специфичните патогени микроорганизми *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, и останати патогени микроорганизми, изолирани од инфицираните четвртинки на млечната жлезда во рана лактација, по истиот редослед бил: 14,8%, 3,9%, 10,2%, 15,6%, 8,6% и 17,9%.

Во истражувањата на Kivaria и Noordhuizen (2007), направени на комерцијални фарми за млечни крави во Танзанија, 29% од испитаните примероци биле микробиолошки негативни. Од микробиолошки позитивните примероци, најпревалентни микроорганизми биле: *Staphylococcus aureus* (25,7%), *Streptococcus agalactiae* (15,4%), *Klebsiella pneumonia* (14,3%), *Escherichia coli* (14,1%), *Pseudomonas aeruginosa* (7,5%), *Streptococcus dysgalactiae* (5,2%), и *Streptococcus uberis* (4,2%). Од габичните инфекции на млечната жлезда, во најголем процент била изолирана *Candida spp.* (30%). Слични резултати со претходните добиле и други автори кои правеле истражувања во комерцијални фарми за млечни крави во Африка (Workineh и сор., 2002). Во истражувањата на Olde Riekerink и сор. (2008), најпревалентен патоген микроорганизам од случаите на клинички мастит во стадата млечни крави во Холандија бил *Staphylococcus aureus*.

Истражувањата од Египет известуваат дека најчесто изолирани патогени микроорганизми од КМТ(+) четвртинки биле *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* и *Escherichia coli*, со преваленција од 52,5%, 31,25% односно 16,25% (Abdel-Rady и Sayed, 2009). Во групата на минорни патогени микроорганизми, изолирани од КМТ(+) четвртинки се вбројува *Pseudomonas spp.*, кој претставувал 2,5% од бактериските изолати. Според истражувањата направени во Алжир, процентот на инфекција со *Pseudomonas spp.* изнесувал 3,03% (Heleili и сор., 2012).

Според Hegde и сор. (2013), најпревалентни патогени микроорганизми изолирани од инфицираната млечна жлезда во Индија биле *Staphylococcus spp.* (коагулаза позитивни и негативни видови), *Streptococcus spp.* и *Escherichia coli*.

Идентични со нашите резултати се резултатите добиени во истражувањата на Rodrigues (2006), при што, најчесто изолирани патогени микроорганизми од крави со мастит биле *Streptococcus agalactiae* и *Staphylococcus aureus*, кои биле изолирани во 35 до 45% од инфекциите на млечната жлезда.

Wilson и сор. (1997) од 1991 до 1995 година во Њујорк и Пенсилванија (САД) утврдиле дека околу 75% од интрамамарните инфекции се предизвикани од *Streptococcus agalactiae*, некои други *Streptococcus* видови, *Staphylococcus aureus* и коагулаза негативни *Staphylococcus* видови. Многу автори истакнуваат дека колиформните микроорганизми од околината, пред сè *Escherichia coli*, се вториот по зачестеност етиолошки агенс кој предизвикува мастит кај млечните крави, веднаш по *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* (Chag и сор., 1993).

Според поновите истражувања направени на фарми за млечни крави во Шведска, најчесто изолирани патогени микроорганизми од случаите на нарушена секреција на млечната жлезда биле: *Staphylococcus aureus* (19%), коагулаза негативните стафилококи (16%), *Streptococcus dysgalactiae* (9%), *Streptococcus uberis* (8%), *Escherichia coli* (2,9%) и *Streptococcus spp.* (1,9%). Микробиолошки негативни биле 22%, а контаминирани 18% од вкупниот број на испитани примероци од млеко од четвртинките на млечната жлезда кои покажале КМТ(+) реакција (Persson и сор., 2011). Интересен податок од истите истражувања е фактот дека *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* и *Streptococcus uberis* биле почесто изолирани во хроничните, отколку во новите случаи на нарушена секреција на млечната жлезда.

Преваленцијата на патогените микроорганизми во случаите на интрамамарни инфекции во стадата млечни крави во Сицилија, во периодот од 2000 до 2006 година, била следна: микробиолошки негативни 47,4%, коагулаза негативни стафилококи 22,6%, *Staphylococcus aureus* 20,6%, *Streptococcus spp.* 11,1%, *Streptococcus agalactiae* 2,3%, колиформни бактерии 2,9% и останати патогени микроорганизми 5,8% (Ferguson и сор., 2007).

Во истражувањата направени на комерцијални фарми за млечни крави во Хрватска, земја со слични климатски услови и навика за одгледување млечни крави како и во Република Македонија, најчесто изолирани патогени микроорганизми при

инфекции на млечната жлезда, во периодот пред засушување, биле *Streptococcus spp.* група В според класификацијата на Ланцефилд (7,79%), *Staphylococcus aureus* (6,56%), коагулаза негативните стафилококи (2,87%), *Pseudomonas spp.* (2,46%), *Streptococcus agalactiae* (2,05%), а 1,23% од инфекциите биле предизвикани од останати патогени микроорганизми (Maćešić и сор., 2012). И други истражувања направени во Хрватска (Benić и сор., 2005) ги посочуваат *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* и останатите стрептококи од околината како најчести причинители на интрамамарни инфекции. Pavlak и сор. (2008) ги сумирале податоците од истражувањата поврзани со појавата на мастит на фармите за млечни крави во Хрватска и заклучиле дека преваленцијата на инфицирани четвртинки на млечната жлезда во 1996 изнесувала 34%, во 2004 година 28,7%, додека во 2008 година изнесувала 23%, што претставува тренд на континуирано намалување на преваленцијата на маститот.

Во единствените, нам достапни податоци, од истражување направено на две фарми за млечни крави во Република Македонија, интрамамарните инфекции во периодот пред засушување на кравите најчесто биле предизвикани од контагиозните микроорганизми кои предизвикуваат мастит, и тоа *Streptococcus spp.* и *Staphylococcus spp.* со преваленција од 64,71% односно 23,53% (Трајчев и сор., 1997).

По направената анализа на бројни епидемиолошки податоци за појавата на мастит во различни земји, Radostiќ и сор. (2007) заклучиле дека преваленцијата на интрамамарни инфекции на ниво на крави изнесува околу 50%, додека 10 до 20% од четвртинките на млечната жлезда се инфицирани со некој патоген микроорганизам.

Во нашите истражувања *Streptococcus agalactiae* изолиран од примероците од млеко покажа осетливост на сите антимикуробни средства на кои беше тестирано, со исклучок на *Co-trimoxazol*. Најрезистентни беа изолатите на *Staphylococcus aureus*. Останатите изолирани патогени бактерии, со одредени исклучоци, покажаа релативно добра осетливост на антимикуробните средства на кои беа тестирано.

Слично како и во нашите истражувања, резистентноста кон останатите антимикуробни средства, со исклучок на *Penicillin G*, била многу ретка меѓу изолираните патогени микроорганизми во случаите на интрамамарна инфекција (Persson и сор., 2011), во споредба со други автори кои укажуваат на поголема резистентност кон антимикуробните средства на патогените микроорганизми кои предизвикуваат мастит (Kalmus и сор., 2011). Во истражувањата на Ebrahimi и сор.

(2007) направени во Иран, идентификувани се истите патогени причинители на мастит од инфицираните четвртинки на млечната жлезда како и во нашите истражувања, при што најголем дел од изолатите покажале антибиотска резистентност кон *Penicillin*, *Streptomycin*, *Oxytetracyclin* и *Colistin*. Во некои други истражувања се укажува на зголемениот тренд на антибиотска резистентност меѓу патогените микроорганизми кои предизвикуваат мастит, со потенцирање на фактот дека соевите на *Staphylococcus aureus* биле најрезистентни (Rossito и сор., 2002; Bengtsson и сор., 2009).

Во европските земји, меѓу патогените микроорганизми изолирани од случаите на мастит, најголема резистентност била забележана кон *Penicillin*, понатаму *Tetracycline*, *Gentamicin* и *Erythromycin* (Hendriksen и сор., 2008).

Повисоката превалентност на контагиозни бактерии во испитуваната популација млечни крави укажува на лошите хигиенски услови на линијата за молзење и можноста за инфицирање на здравите крави преку опремата за молзење и рацете на молзачите.

Од аспект на оксидативниот стрес, присуството на патогени микроорганизми во млекото било проследено со значајно зголемување на активноста на антиоксидативните ензими во млекото. Притоа, авторите истакнуваат дека зголемената активност на овие ензими тесно е поврзана со видот на патогениот микроорганизам. Така, највисока ензимска активност била измерена во млекото инокулирано со *Escherichia coli*, кога таа била за десет пати поголема отколку ензимската активност во нормалното млеко (Matei и сор., 2011). Во примероците од млеко инокулирани со *Streptococcus viridians*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Candida spp.* била евидентирана поумерено зголемена ензимска активност, додека најниска ензимска активност покажале примероците од млеко инокулирани со *Staphylococcus aureus* во однос на примероците млеко во кои биле инокулирани други патогени микроорганизми. Според овие автори, зголемената активност на антиоксидативните ензими во примероците од млеко инокулирани со одредени патогени микроорганизми кои предизвикуваат инфекции на млечната жлезда, се должи на синтезата на овие ензими, пред сè на супероксид дисмутазата во самите микроорганизми, со цел да се одбранат од фагоцитната и неутрализирачка активност на неутрофилите.

6.3. КАЛИБРАЦИЈА НА РЕАКЦИИТЕ ЗА ОДРЕДУВАЊЕ НА АКТИВНОСТА НА АНТИОКСИДАТИВНИТЕ ЕНЗИМИ ВО КРВ И МЛЕКО

Пресметаната специфична активност на супероксид дисмутазата (SOD) во крвниот серум на кравите за целиот период на истражување, во периодот пред телење изнесуваше $24,20 \pm 2,319$ mU/mg протеини, во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата $43,94 \pm 3,864$ mU/mg протеини и во периодот од 22. до 42. ден во лактацијата $26,77 \pm 2,201$ mU/mg протеини. Специфичната активност на SOD во млечниот серум на кравите беше приближно 2 до 3 пати повисока во споредба со неговата активност во крвниот серум во истите периоди на земање материјал за испитување и изнесуваше $91,67 \pm 7,927$ mU/mg протеини за периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата и $90,89 \pm 8,526$ mU/mg протеини во периодот од 22. до 42. ден во лактацијата. Поголемата активност на SOD во млечниот серум на кравите во споредба со неговата активност во крвниот серум се должи на единицата во која е изразена истата, односно беше користена специфичната активност на ензимот во однос на вкупната содржина на протеини во испитуваниот биолошки материјал.

Во литературните податоци, изнесените вредности за активност на SOD во крвта варираат во зависност од сензитивноста на методот кој се користел за одредување на активността и единиците во кои била изразена истата. Така, на пример, според истражувањата на Festila и сор. (2012), активността на SOD во еритроцитите изнесувала од $1786,52 \pm 76,36$ U/g Hb до $1878,61 \pm 88,59$ U/g Hb додека според Maugya и сор. (2014), активността на SOD во крвта изнесувала од $27,25 \pm 1,37$ U/L крв до $170,86 \pm 0,76$ U/L крв.

Спротивно на добиените резултати во нашето истражување, повеќе автори истакнуваат дека млекото содржи пониска активност на ензимот отколку крвта. L'Abbe и Friel, (2000) изнесуваат податок според кој активността на SOD во плазмата изнесувала 0,2 до 0,4 mU/mg протеини, а во хуманото млеко активността на ензимот била 10 - 25 пати помала. Активността на SOD во кравјото млеко, според Lindmark-Maensson и Akesson (2000) се движи во границите од 0,92 до 1,27 U/ml, а според податоците изнесени од Filipović и сор. (2005) и Kasarović и сор. (2005) била во границите од 2 до 3 U/mg протеини. Постојат истражувања во кои авторите не успеале да детектираат активност на SOD во млеко (Kovaceva и сор., 2007). Andrei и

сop. (2010) утврдиле дека просечната активност на ензимот во кравјото млеко изнесувала 1,088 U/ml млеко, односно 1688 U/g Hb во крвта.

Присуството на SOD во млекото е важно од аспект на неговата оксидативна стабилност. Holbrook и Hicks (1978) и Korycka-Dahl и сop. (1979) информираат дека SOD во кравјото млеко била електрофоретски и структурно (Fox и Kelly, 2006) идентична со SOD во говедските еритроцити, но не откриле доказ дека постои SOD која доаѓа од бактериските клетки и леукоцитите присутни во млекото. Тие, исто така, информираат дека целата активност на SOD во млекото била во серумската фаза и не постоела активност на ензимот што е поврзана со липидната фракција на млекото.

Одредувањето на активноста на ензимот SOD во реактивната мешавина беше направена со користење на индиректниот кинетички метод базиран врз истражувањата на Marklund и Marklund, (1974) и Gao и сop. (1998), модифицирана за изведување во микротитарска плоча. Овој метод претставува рапиден, конвекционален и прецизен метод, широко прифатен во научните истражувања, со можност да детектира многу мали количества од ензимот (Doyle, 1997).

Violi и сop. (1985) во нивните истражувања користејќи спектрофотометриски метод базиран врз автооксидацијата на пирогалолот за одредување на SOD во биолошките течности, заклучиле дека реакцијата била зависна од рН-вредноста на реактивната мешавина. Процентот на раст на апсорбанцата на 415 nm пропорционално се зголемувал со растот на рН-вредноста во границите од 8,2 до 8,9. Сепак, методот давал најдобра сензитивност и репродуктивност при рН=8,5 на реактивната мешавина. Тогаш инхибицијата на автооксидацијата на пирогалолот во опсег од 30 и 65% била високо зависна со активноста на супероксид дисмутазата, а растот на апсорбанцата покажувал линеарност до 3 минути. Според други автори пак, активноста на SOD е независна при рН-вредноста на медиумот во опсег од 5,5 до 9,5 (Gao и сop., 1998).

Во истражувањата на Marklund и Marklund (1974), кога првпат била употребена автооксидацијата на пирогалолот за одредување на активноста на SOD, процентот на автооксидацијата растел пропорционално со зголемувањето на рН-вредноста, и тоа: при рН=7,9 реакцијата била 99% инхибирана од SOD, додека на рН=9,1 реакцијата била повеќе од 90% инхибирана од присутната SOD. При повисока рН-вредност на реактивната мешавина, независниот механизам на

автооксидација станал доминантен и повеќе не зависел од присуството на SOD во системот на реакции. Така, при $pH=10,6$ автооксидацијата била инхибирана само 15% од SOD.

Присуството на диетилен триамин пентаоцетна киселина (DTPA) во реактивната мешавина е важно од аспект на хелатор кој се врзува за присутните метални јони во примерокот, а кои пак може да дадат друг тек на реакцијата. Во нејзино отсуство, автооксидацијата би била побрза и помалку зависна од присуството на SOD.

Кога активноста од 1U SOD била дефинирана како 50% инхибиција на автооксидацијата на пирогалолот, таа единица била двапати повисока отколку добиената во системот за генерирање на супероксидни радикали ксантин/ксантин оксидаза (Beyer и Fridovich, 1987). Резултатите од мерењето на активноста на SOD во системот на реакции потврдиле дека ензимот е невообичаено стабилен (Patel и Katyare, 2006).

Активноста на ензимот глутатион пероксидаза (GPx) во крвниот серум на кравите беше приближно 1,5 пати повисока во споредба со неговата активност во млечниот серум. Пресметаната активност на GPx во крвниот серум на испитуваните крави, во периодот пред телење изнесуваше $251,79 \pm 9,363$ mU/mg протеини, во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата $372,45 \pm 17,533$ mU/mg протеини и во периодот од 22. до 42. ден во лактацијата $319,40 \pm 14,307$ mU/mg протеини. Активноста на ензимот GPx во млечниот серум на испитуваните крави изнесуваше $231,90 \pm 12,133$ mU/mg протеини за периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата и $236,16 \pm 13,175$ mU/mg протеини за периодот од 22. до 42. ден во лактацијата.

Според литературните податоци, активноста на GPx изнесува околу 16,4 U/mg протеини во крвта и 77 ng/ml во млекото (Debski и сop., 1987; Avissar и сop., 1991; Lindmark-Mansson и сop., 2001). Во повеќе истражувања била утврдена неколкукратно поголема активност на GPx во крвниот серум во споредба со млечниот серум (Lindmark-Mansson и Akesson, 2001).

Според други литературни податоци, активноста на GPx во млеко се движи меѓу 12 и 32 U/ml (Hojo, 1982; Avissar и сop., 1991; Przybylska и сop., 2007), која се должела пред сè на вонклеточната форма на ензимот. Chen и сop. (2000), во нивните истражувања информираат за поголема активност на ензимот во млекото (24,5 до

50,6 U/ml). Debski и сор. (1987) истакнуваат дека активноста на GPx во хуманото и во кравјото млеко е приближно идентична и изнесува околу третина од вкупната пероксидазна активност.

Matei и сор. (2011) изнесуваат податок дека активноста на ензимот GPx во нормалното кравјо млеко изнесувала 33 U/ml, при што неговата активност строго била поврзана со концентрацијата на селенот во млекото.

Во нашите истражувања, активноста на GPx во крвниот и млечниот серум беше одредена со помош на индиректниот кинетички метод базиран врз истражувањата на Paglia и Valentine (1967), модифицирана според Chen и сор. (2000) за изведување во микротитарска плоча.

Во истражувањата на Chen и сор. (2000) била демонстрирана спонтаната неензимска оксидација на NADPH во Бланк-реакција, кога само во фосфатен пуфер заедно биле измешани GSH, GR, NADPH, и tert-butyl H₂O₂. Процентот на оксидација растел линеарно кога концентрацијата на tert-butyl H₂O₂ се зголемила од 0,3 до 5 mmol/L, а концентрацијата на GSH се зголемила од 2,5 на 6 mmol/L. Меѓутоа, промените во концентрацијата на NADPH немале влијание врз реакцијата. Стапката на оксидација во Бланк-реакцијата се зголемила за трипати кога pH-вредност се променила од 7,0 на 8,0, tert-butyl-от H₂O₂ бил застапен во концентрација од 0,63 mmol/L, а GSH 1,25 mmol/L. При промени во концентрацијата на фосфатниот пуфер од 25 до 100 mmol/L, активноста на GPx опаѓала, додека процентот на оксидација во Бланк-реакција се зголемувал. Ова индицира дека пониската концентрација на пуферот ја фаворизира активноста на ензимот. Истите автори ја тестирале реакцијата за одредување на активноста на GPx во млечниот серум, при што констатирале дека идеална pH-вредност на реакцијата е 7,6. Освен тоа, врз реакцијата имала влијание и температурата на реактивната мешавина. Така, кога реакцијата се одвивала на 25⁰C во споредба со 37⁰C, активноста на ензимот во млечниот серум била за 30% пониска. Кога концентрацијата на NADPH се менувала од 0,2 до 0,4 mmol/L, а концентрацијата на глутатион редуказата (GR) од 5 µg/L до 12,5 µg/L, немало сигнификантни промени во активноста на GPx.

Во научните истражувања, за одредување на активноста на GPx во крвта и млекото биле користени неколку варијанти на реакцијата (Debski и сор., 1987; Avissar и сор., 1991). Генерален заклучок бил дека во реакцијата за одредување на активноста на GPx во млечниот серум потребно е двојно пониска концентрација на

редуциран глутатион (GSH) во споредба со реакцијата во крвен серум. Една од причините за ова е што крвниот серум главно содржи целуларен GPx од еритроцитите, додека главната форма на GPx во млекото е екстрацелуларната (Lindmark-Mansson и сop., 2001; Lindmark-Mansson и Akesson, 2001). Друга важна разлика меѓу двете форми на GPx е што вонклеточната форма на ензимот има пониска константа во соодносот кон GSH отколку клеточната форма на ензимот и препорачуваат употреба на 3 до 20 пати повисока концентрација на пероксиден супстрат при одредување на активноста на вонклеточната GPx (Chen и сop., 2000). Lindmark-Mansson и сop. (2001) истакнуваат дека активноста на екстрацелуларната GPx во млекото е многу постабилна на термички третман и на пониска pH-вредност во споредба со целуларната форма на ензимот. Уште постабилна била активноста на ензимот во млечниот серум.

Chen и сop. (2000) истакнуваат дека стабилноста на ензимот во крвниот и млечниот серум, чувани на температура од -80°C , за период од 13 месеци се губи 44% од активноста.

Меѓутоа, Stagsted (2006) истакнува дека постојат низа недоследности и потешкотии при калибрирањето на реакцијата за одредување на активноста на GPx во млечниот серум, додека реакцијата во крвниот серум се одвива без потешкотии и таа е линеарно зависна од концентрацијата на супстратот GSH и tert-butyl H_2O_2 .

Друга група на автори истакнуваат дека не постои разлика во активноста на GPx во полното млеко и млечниот серум (Debski и сop., 1987; Avissar и сop., 1991; Chen и сop., 2000). Според нив, активноста на ензимот во хуманото и кравјото млеко е приближно идентична.

Во биолошките системи, зголемената активност на SOD предизвикува зголемена концентрација на водороден пероксид (H_2O_2) како резултат на дисмутацијата на супероксидните анјони (O_2^-), што понатаму индицира зголемена активност на GPx и каталазата, кои го редуцираат H_2O_2 во H_2O , додека органските пероксиди (R-O-O-H) ги редуцира до соодветен стабилен алкохол (Kehrer и Smith., 1994). GPx има многу повисока Михалис-Мененова (Michaelis-Menten) константа за H_2O_2 отколку каталазата, со што има поголема улога во неговата детоксикација (Jones и сop., 1981). Од овие причини, сосема логични беа резултатите добиени од Моделот 3 за влијанието на фиксните фактори на специфичната активност на GPx во крвниот серум, кога високо статистички значајно влијание покажа активноста на

SOD во крвниот серум на кравите. Исто така, постоеше мала но статистички значајна корелација меѓу активноста на GPx во крвниот серум и SOD во крвниот серум на кравите, како и меѓу активноста на GPx во млечниот серум и SOD во млечниот серум на кравите.

6.4. ПОВРЗАНОСТ ПОМЕЃУ ЗДРАВСТВЕНИТЕ НАРУШУВАЊА НА МЛЕЧНАТА ЖЛЕЗДА И ЕНЗИМСКИОТ АНТИОКСИДАТИВЕН СТАТУС

Во испитуваната популација млечни крави, преваленцијата на нарушената секреција на млечната жлезда, за целиот период на истражување, изнесуваше 23,70%, а на интрамамарните инфекции - 19,43%, или вкупно, преваленцијата на здравствените нарушувања изнесуваше 43,13%.

Пресметаната преваленција за нарушената секреција и за интрамамарните инфекции е релативно висока, особено ако се има предвид фактот дека се однесува само на периодот на рана лактација, до 42. ден по телење и тоа на ограничена популација млечни крави.

Во научната литература се сретнуваат различни вредности за преваленцијата на мастит во стадата млечни крави. Ова, пред сè, се должи, на користењето на различни дијагностички алатки за откривање на маститот. Така, за негова дијагностика се користат брзи скрининг-тестови, одредување на вкупниот број на соматски клетки во млекото и/или културелни испитувања, за сигурна потврда на случаите на мастит. Освен тоа, врз појавата на маститот влијание имаат и климатските услови, сезоната во годината, менаџментот на фармата и индивидуалните карактеристики на животните. Високата преваленција на нарушена секреција во раната лактација се должи на постоењето на инфекција на млечната жлезда во сувостојниот период. Преваленцијата на маститот во останатиот период од лактацијата главно зависи од исхраната, условите на одгледување и хигиената на молзењето (Radostits и соp., 2007).

Постојат многу литературни податоци во кои податоците за преваленцијата на супклиничкиот мастит кај млечните крави, базирана врз резултатите од калифорниа маститис тестот (КМТ), меѓу себе доста се разликуваат, а се движат од 15,6% до 39,7% (Ferreiro и соp., 1985; de Freitas и Magalhaes, 1990; Ribeiro и соp., 1991; Vieira-da-Motta и соp., 2001). Во некои земји во развој податоците за

преваленцијата на супклиничкиот мастит на ниво на крави се уште поразлични. Така, за Етиопија има податок дека преваленцијата изнесувала 25,4% (Abera и сор., 2012) и 46,42% (Ayano и сор., 2013), за Танзанија - 75,9% (Karimuribo и сор., 2006), за Уругвај - 52,4% (Giannechini и сор., 2002), за Бангладеш - 20,2% (Sarker и сор., 2013), и за Уганда изнесувала 86,2% (Abrahmsén и сор., 2013).

Elbably и сор. (2013) утврдиле нешто повисока преваленција на нарушена секреција на млечната жлезда, во споредба со нашите резултати (29,62% до 36,75%). За разлика од претходните автори, Heleili и сор. (2012) утврдиле многу повисока преваленција на нарушена секреција кај кравите (96,36%), во однос на нашите истражувања.

Вкупната преваленција на здравствените нарушувања на четвртинките на млечната жлезда за целиот период на истражување, покажа ист сооднос за двата периода во лактацијата, односно изнесуваше 9,36% за периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата и 9,83% за периодот од 22. ден до 42. ден во лактацијата. При тоа, преваленцијата на нарушената секреција на четвртинките на млечната жлезда за целиот, двегодишен период на истражување, имаше слични вредности за двата периода во лактацијата, односно 5,33% за периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата и 5,45% за периодот од 22. до 42. ден во лактацијата. Сличен сооднос постоеше и меѓу вредностите за преваленцијата на интраматарните инфекции, каде што преваленцијата за периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата изнесуваше 4,03%, а за периодот од 22. до 42. ден во лактацијата - 4,38%.

Висока преваленција на супклинички мастит во фармите со машинско молзење на кравите било евидентирано и од Mir и сор. (2014) која изнесувала 57,80% заболени крави и 30,73% заболени четвртинки на млечната жлезда. Според најновите истражувања на Ramirez и сор. (2014), со користење на КМТ и одредување на бројот на соматски клетки во млекото како дијагностичка алатка, преваленцијата на нарушената секреција на млечната жлезда изнесувала од 19,9% до 51,3%.

Според истражувањата на Saidi (2013), преваленцијата на супклиничкиот мастит, дијагностициран врз база на КМТ, изнесувала 29,62% заболени крави и 29,20% заболени четвртинки на млечната жлезда. Слични резултати биле добиени и во истражувањата на Kivaria и сор. (2004) и Rasmussen и сор. (2005).

Ares и сор. (1995) користејќи културелни испитувања утврдиле преваленција на супклиничкиот мастит од 33,5%, додека Ferrara и сор. (1999) користејќи директни и индиректни методи, како и културелни методи, рапортираат преваленција на супклиничкиот мастит од 30,18%.

Преваленцијата на супклиничкиот и клиничкиот мастит во истражувањата на Zeryehun и сор. (2013) изнесувала 55,1%, односно 19,6% заболени крави, додека преваленцијата на заболени четвртинки на млечната жлезда - 42,7%, односно 5,2%. Во истражувањата на Mekibib и сор. (2010), преваленцијата на клиничкиот и супклиничкиот мастит изнесувала 22,4%, односно 48,6% заболени крави, а преваленцијата на заболени четвртинки на млечната жлезда - 10,0%, односно 34,8%. Вкупната преваленција на мастит во рана, средна и доцна лактација изнесувала 87,2%, 65,9%, односно 73,1%. Други автори изнесуваат податоци според кои преваленцијата на мастит во стадата млечни крави изнесувала од 1,2 до 21,5% за клиничките форми на болеста, односно 19 до 46,6% за супклиничките форми на болеста (Workineh и сор., 2002; Abunna и сор., 2013).

Многу автори во нивните истражувања изнесуваат висок процент на интрамамари инфекции до високи 97% кај првотелките (Trinidad и сор., 1990; Pankey и сор., 1991; Owens и сор., 2001), при што 24-75% од четвртинките и 25-97% од кравите биле инфицирани во периодот пред телење.

Во однос на ефикасноста на КМТ во дијагностиката на маститот, Yang и сор. (2011) утврдиле дека од 52,4% четвртинки со нарушена секреција, бактериолошки позитивни биле 36,3% од четвртинките.

Според Dingwell (2002), вообичаено преваленцијата на инфицирани четвртинки изнесувала од 5 до 28%, независно од нивната поставеност на млечната жлезда.

Во однос на маркерите на оксидативниот стрес, специфичната активност на ензимот супероксид дисмутаза (SOD) во крвниот серум во периодот 21. ден пред телење беше зголемена во групите на крави со нарушена секреција на млечната жлезда ($30,25 \pm 5,322$ mU/mg протеини) и интрамамари инфекција ($26,02 \pm 6,536$ mU/mg протеини) во споредба со контролната група, КМТ(-) крави ($21,05 \pm 2,589$ mU/mg протеини). Истиот тренд беше забележан и во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата, кога активноста на SOD во крвниот серум изнесуваше од $43,65 \pm 7,262$ mU/mg протеини до $48,47 \pm 7,895$ mU/mg протеини кај

КМТ(+) крави и $42,51 \pm 5,481$ mU/mg протеини кај КМТ(-) крави. Во периодот од 22. до 42. ден во лактацијата, активноста на SOD беше намалена во групите на крави со здравствени нарушувања на млечната жлезда во споредба со здравата, контролна група, КМТ(-) крави. Евидентно беше дека во групата КМТ(-) крави, независно од сезоната на телење, активноста на SOD во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата е повисока во споредба со периодот од 22. до 42. ден во лактацијата. Истиот тренд се забележува и кај КМТ(+) крави, и тоа кај двете подгрупи на крави, крави со нарушена секреција на млечната жлезда и крави со интрамамарна инфекција, но со поизразени пикови во зголемувањето и намалувањето на активноста на ензимот. Од добиените резултати се забележува пониската активноста на SOD во млечниот серум, во двата периода на земање примерок кај КМТ(-) крави во споредба со активноста во млечниот серум кај КМТ(+) крави. Сепак, здравствените нарушувања на млечната жлезда не покажаа статистички значајно влијание врз активноста на SOD во крвниот серум на кравите во испитуваната популација, но влијанието на активноста на ензимот во млечниот серум се приближуваше до статистички значајно на ниво $p < 0,05$ ($p = 0,058$).

Kleczkowski и сор. (2008) утврдиле зголемена активност на SOD во крвниот серум на крави со интрамамарни инфекции, зависно од присуството на различни патогени микроорганизми кои предизвикуваат мастит. Machado и сор. (2014) заклучиле дека кравите заболени од мастит имаат намалена активност на SOD во крвниот серум, а додавањето на микроелементи во храната ја зголемува неговата активност.

За првпат, присуството на SOD во млекото од крави било изнесено од Hicks и сор. (1975), кои истакнале дека ензимот игра важна улога во оксидативната стабилност на млекото. Просечната активност на SOD во млекото од нормалните четвртинки на млечната жлезда изнесувала $1,82 \pm 0,11$ U/ml, со варијации во границите од 0,67 до 3,23 U/ml. Просечната активност во млеко од четвртинки со нарушена секреција изнесувала $1,6 \pm 0,12$ U/ml, со варијации во границите од 0,39 до 3,02 U/ml.

Според Andrei и сор. (2010), активноста на SOD во млекото на здрави крави изнесувала $1,044 \pm 0,17$ U/ml, додека во млекото на крави заболени од мастит изнесувала $1,066 \pm 0,15$ U/ml. Според истите автори, активноста на SOD во крвта на

здрави крави изнесувала $1688,4 \pm 165,48$ U/g Hb, додека во крвта на крави заболени од мастит изнесувала $1764,5 \pm 110,46$ U/g Hb.

Сепак, Sordillo и Aitken (2009) заклучиле дека податоците за поврзаноста на SOD и здравјето на млечната жлезда се сиромашни и потребни се дополнителни истражувања.

Специфичната активност на ензимот глутатион пероксидаза (GPx) во крвниот серум во периодот 21. ден пред телење и периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата беше зголемена во групите крави со нарушена секреција на млечната жлезда ($264,48 \pm 20,084$ mU/mg протеини до $414,58 \pm 39,734$ mU/mg протеини) и кравите со интрамамарна инфекција ($271,86 \pm 21,399$ mU/mg протеини до $428,14 \pm 47,843$ mU/mg протеини) во споредба со контролната група на КМТ(-) крави ($239,65 \pm 12,137$ mU/mg протеини до $335,87 \pm 19,842$ mU/mg протеини). Истиот тренд беше забележан и во периодот од 22. до 42. ден во лактацијата, кога најголемата активност на GPx во крвниот серум беше регистрирана кај кравите со интрамамарна инфекција ($362,59 \pm 30,212$ mU/mg протеини), а КМТ(-) крави имаа нешто поголема активност на GPx ($311,34 \pm 20,551$ mU/mg протеини) во споредба со кравите кои имаа нарушена секреција на млечната жлезда ($303,31 \pm 24,283$ mU/mg протеини). Евидентно беше дека во здравата, контролна група на КМТ(-) крави, независно од сезоната на телење, активност на GPx во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата е повисока во споредба со периодот од 22. до 42. ден во лактацијата. Спротивно, во групата крави со нарушена секреција на млечната жлезда и групата крави со интрамамарна инфекција, активност на ензимот е пониска во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата во споредба со периодот од 22. до 42. ден во лактацијата.

Генерално, активност на GPx во млечниот серум е зголемена во групите на крави со нарушена секреција на млечната жлезда и кравите со интрамамарна инфекција во споредба со контролната, здрава група КМТ(-) крави. Здравствените нарушувања на млечната жлезда покажаа статистички значајно влијание на активност на GPx во крвниот ($p < 0,001$) и во млечниот серум ($p < 0,05$). Постоеше статистички значајна разлика во средните вредности за специфичната активност на GPx во крвниот и во млечниот серум меѓу групите на крави со нарушена секреција на млечната жлезда и кравите со интрамамарна инфекција во однос на здравата група КМТ(-) крави.

Зголемената активност на SOD претставува адаптивен механизам на зголемената концентрација на супероксидните анјони, а дизбалансот меѓу ензимите SOD и GPx може да претставува маркер за оксидативен стрес во организмот на животните (Mehta и Li, 2001). Понатаму, промените во физиолошкиот сооднос на ензимите SOD и GPx има значаен ефект на клеточната резистентност спрема оксидативното оштетување и уништување (De Naan и сор., 1996). GPx го елиминира водородниот пероксид генериран при дисмутацијата на слободните радикали, со што директно придонесува за намалување на концентрацијата на реактивните оксидативни метаболити во крвта (Droge, 2002).

Постојат контрадикторни податоци за активноста на GPx во крвта и еритроцитите при појава на воспалителни процеси во организмот. Така, Egisir и сор. (2006) информираат за намалена активност, други (Cimen и сор., 2000) дека не постојат значајни промени во активноста на ензимот, додека трети информираат за зголемена активност (Mezes и сор., 1987).

Parantainen и сор. (1987) забележале дека концентрацијата на слободните радикали во крвта на кравите заболени од мастит била зголемена, додека активноста на GPx е намалена, што било во сигнификантна позитивна корелација со преваленцијата на интрамамарните инфекции предизвикани од главните патогени микроорганизми.

Ranjana и сор. (2005) информираат за намалување на концентрацијата на антиоксидансите во крвта при состојбите на воспаленија на млечната жлезда. Според Jhambh и сор. (2013), кравите заболени од клинички мастит имале пониска активност на антиоксидативните ензими и поголема концентрација на малондиалдеhid (MDA) во крвта, споредено со здравата, контролна група крави. Намалувањето во активноста на GPx во крвта на кравите со мастит најверојатно е поврзано со зголемената липидна пероксидација и настанувањето на оксидативен стрес како резултат на одбранбените механизми на организмот на животното.

Kizil и сор. (2007) регистрирале статистички значајни промени во концентрацијата на антиоксидансите во крвта меѓу групите на здрави крави и крави заболени од супклиничка и клиничка форма на мастит.

Erskine и сор. (1987) успеале да докажат негативна корелација помеѓу преваленцијата на интрамамарните инфекции во стадо млечни крави и активноста на GPx во крвта. Спротивно, Ndiweni и сор. (1991) не пронашле поврзаност меѓу

активноста на GPx во крвта и маститот во стада со ниска и висока преваленција на ова заболување. Меѓутоа, базирајќи се врз многу истражувања, може да се заклучи дека селенот, како активна компонента на GPx и витаминот E, имаат позитивен ефект врз здравјето на млечната жлезда и неспецифичната одбрана на организмот (Dobbelaar и сop., 2010; Wang и сop., 2010).

Karyak и сop. (2011) во нивните истражувања не пронашле статистички значајна разлика во активноста на SOD и GPx во еритроцитите помеѓу групата крави заболени од нарушена секреција и здравите крави.

Atroshi и сop. (1986) информираат за намалена активност на GPx во крвта и во млекото од крави со нарушена секреција, но зголемена активност на SOD во крвта, што се должело на промените во липидната пероксидација и присуството на простагландин. Меѓутоа, значајните промени во активноста на антиоксидативните ензими биле поврзани со јачината на воспалителните процеси.

Dalir и сop. (2006) пресметале дека релативниот ризик за намалување на активноста на GPx при инциденција на мастит изнесувал 3,95. Но сепак, според резултатите од нашето истражување, при појава на здравствени нарушувања на млечната жлезда, на почетокот од заболувањето, активноста на GPx е поголема, но со текот на времето и напредувањето на воспалителните процеси, активноста на ензимот се намалува. Ова најверојатно се должи на трошењето на GPx за неутрализација на создадените пероксиди.

Suriyasatharog и сop. (2009) истакнуваат дека постои позитивна поврзаност меѓу зголемениот број на соматски клетки во млекото и концентрацијата на малондиалдехидот (MDA - индикатор за липидната пероксидација) што индицира дека авто-оксидативните процеси се забрзуваат при настанување на воспалителни процеси во млечната жлезда. Според истите автори, активноста на GPx била сигнификантно пониска во пробите од млеко од четвртинките на млечната жлезда со нарушена секреција во споредба со нормалното млеко, додека не биле забележани разлики во активноста на SOD во млекото.

Holbrook и Hicks (1978) го потенцирале значењето на антиоксидативните ензими за стабилноста на млекото. Сепак, постојат ограничен број литературни податоци за поврзаноста на антиоксидативните ензими во млекото и појавата на супклинички или клинички форми на мастит. Досега, во научните истражувања, како индикатори за нарушена секреција кај млечните крави, користени се лактат

дехидрогеназата и алкалната фосфатаза (Babaei и сор., 2007). Некои автори ја потенцираат позитивната поврзаност помеѓу NAG-азата (N-acetyl- β -D-glucosaminidasa) и GPx во млекото, како ензими кои учествуваат во воспалителните процеси, со напомена дека улогата на GPx не е до крај дефинирана (Fox и Kelly, 2006). Најверојатно, поврзаноста меѓу антиоксидативните и воспалителните ензими во млечната жлезда се базира врз механизмите за појава на мастит, кога главна улога има пероксидацијата на макромолекулите, поврзано со оксидативните процеси. Според истите автори, не постоела значајна разлика во активноста на GPx меѓу пробите од млеко од четвртинките на млечната жлезда зафатени од воспалителни процеси и здравите четвртинки, потврдувајќи дека во здравите четвртинки се одвиваат слични метаболички процеси. Меѓутоа, постоела позитивна корелација меѓу антиоксидативните и воспалителните ензими во млекото од сите четвртинки на млечната жлезда, што води до заклучок дека сите имаат еднаков ризик да бидат зафатени од воспалителен процес. Дополнително, Berry и Meaney (2006) истакнуваат дека улогата на GPx е во заштитата на жлезденото ткиво на млечната жлезда, но и на новородените животни од деструктивното дејство на POM и намалувањето на интензитетот на оксидативниот стрес.

Според Yang и сор. (2011), концентрацијата на малондиалдеhidот и активноста на лактат дехидрогеназата и алкалната фосфатаза биле сигнификантно повисоки во млекото од четвртинките со нарушена секреција во споредба со пробите од млеко од здравите четвртинки на млечната жлезда, додека активноста на глутатион пероксидазата била значајно намалена. Не биле утврдени разлики во активноста на SOD и аспарат трансферазата во млекото од четвртинките со нарушена секреција и здравите четвртинки на млечната жлезда. Активноста на GPx во нормалното млеко изнесувала $32,8 \pm 1,41$ U/ml, во споредба со млекото од четвртинките со нарушена секреција ($26,41 \pm 2,03$ U/ml).

Andrej и сор. (2011) забележале повисока активност на GPx во млекото од крави со нарушена секреција на млечната жлезда во споредба со здравите крави, додека не постоела сигнификантна разлика во активноста на ензимот во крвта.

Во истражувањето на Named и сор. (2008), пресметаната активност на GPx во млекото изнесувала $33,02$ U/g протеини, при што била утврдена позитивна корелација меѓу активноста на ензимот и вкупниот број на соматски клетки во млекото, особено со неутрофилите, кои се првата одбранбена линија од бактериските

инфекции на млечната жлезда. Истите автори заклучиле дека слободните радикали формирани во млекото со зголемен број на соматски клетки, всушност се водороден пероксид, за чија неутрализација е потребен GPx. Затоа, концентрацијата и активноста на GPx во млекото го детерминира степенот на заштита на млечната жлезда од оксидативен стрес. Притоа, не била утврдена корелација меѓу активноста на ензимот GPx и SOD во млекото. Постоела слаба поврзаност меѓу активноста на SOD во млекото и вкупниот и диференцијалниот број на соматски клетки во млекото, укажувајќи дека полиморфонуклеарните клетки се минорни генератори на супероксидни радикали.

Andrej и сор. (2010) истакнуваат дека активноста на SOD значајно не се променила во млекото од маститични крави во споредба со здравите крави, и не била во корелација со вкупниот број на соматски клетки во млекото. Меѓутоа, зголемената активност на антиоксидативните ензими во млекото било поврзано со промените во активноста на ензимите во крвта. Истовремено, со зголемување на бројот на соматски клетки во млекото, забележително било зголемувањето на концентрацијата на малондиалехидот.

Како заклучок од анализата на литературните податоци, следува дека оксидативниот стрес во млечната жлезда се должи на формирањето на водороден пероксид како резултат од активноста на имунолошките клетки. Затоа, зголемениот број на соматски клетки во млекото не индицира зголемена активност на SOD, како прва антиоксидативна бариера, и нема потреба од негова интервенција. Всушност, супероксидните радикали (O_2^-) во млекото немаат потреба од дисмутација, туку тие играат важна улога на сигнални молекули во воспалителната реакција. Затоа, најодговорен антиоксидативен ензим во млекото, одговорен за редуцирање на водородниот пероксид и неутрализација на оксидативниот стрес претставува GPx. Меѓутоа, до денес, постојат многу ограничени литературни податоци за поткрепување на оваа хипотеза (Chen и сор., 2000). Нашето истражување дава придонес кон одговорот на прашањата поврзани со појавата на оксидативен стрес кај млечните крави поврзан со воспалителните процеси во млечната жлезда.

Во нашите истражувања беше утврдена слаба поврзаност меѓу активноста на антиоксидативните ензими во кравјото млеко. Сепак, антиоксидативниот систем SOD/GPx е присутен во кравјото млеко и може да се активира во случаите на акутен оксидативен стрес, кога во млечната жлезда ќе се акумулира голема концентрација

на оксидативни радикали, особено во преодниот период кај кравите, од стелност кон лактација. Позитивната корелација меѓу реакцијата на КМТ и активноста на ензимот GPx ни дава за право да заклучиме дека овој ензим може да се користи како индикатор за нарушена секреција кај млечните крави во периодот на рана лактација.

Kleczkowski и сор. (2005) информираат дека антиоксидативниот статус на крвта се намалува во состојбите на воспаление на млечната жлезда и препорачуваат додавање на антиоксиданси во исхраната, како на пример бакар, аскорбинска киселина и витамин Ц, со цел подобро менаџирање на маститот кај млечните крави и зголемување на резистентноста кон него. Способноста да се контролира степенот на оксидативен стрес во организмот на млечните крави може да биде ефикасно за контрола на јачината на воспалителните процеси меѓу кои и маститот. Pandey, и сор. (2011) истакнуваат дека колостралното млеко поседува висок антиоксидативен капацитет што ја штити млечната жлезда и новороденото животно од манифестирање на оксидативен стрес, со што придонесува за пониска смртност и подобар раст на младите (Dibner и сор., 2011). Меѓутоа, Salganik (2001) тврди дека прекумерната исхрана со антиоксиданси, парадоксално, може да предизвика создавање и акумулирање на поголеми количества реактивни оксидативни метаболити. Некои подамнешни истражувања, исто така, ја докажале поврзаноста меѓу нарушениот антиоксидативен систем, неизбалансираната исхрана без додатоци на антиоксиданси и приемливоста на кравите кон мастит во постпарталниот период (Ndiweni и Finch, 1996). Меѓутоа, во научните истражувања, не е пронајдена зависност меѓу исхраната со органски извори на цинк, манган, бакар и кобалт, промените во бројот на соматски клетки во млекото и активноста на SOD и GPx (Siciliano-Jones и сор., 2008). Но сепак, овие автори истакнуваат дека исхраната со органски извори на микроелементи била ефикасна во намалувањето на инциденцијата на нарушена секреција во стадата млечни крави, што најверојатно се должи на нивното позитивно влијание врз одбранбените механизми на млечната жлезда.

6.5. ВЛИЈАНИЕ НА ЛАКТАЦИЈАТА ВРЗ ЗДРАВСТВЕНИТЕ НАРУШУВАЊА НА МЛЕЧНАТА ЖЛЕЗДА И ВРЗ АКТИВНОСТА НА АНТИОКСИДАТИВНИТЕ ЕНЗИМИ

Преваленцијата на нарушената секреција на млечната жлезда, за целиот двегодишен период на истражување, од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата изнесуваше 16,59%, преваленцијата на интрамамарните инфекции изнесуваше 11,37%, или вкупната преваленција на здравствените нарушувања на млечната жлезда изнесуваше 27,96%. Речиси идентична вредност беше добиена за вкупната преваленција на здравствените нарушувања на млечната жлезда за периодот од 22. ден до 42. ден во лактацијата, која изнесуваше 27,49%. Меѓутоа, во овој период, преваленцијата на нарушената секреција на млечната жлезда покажа пониска вредност (14,22%) додека преваленцијата на интрамамарните инфекции повисока вредност (13,27%) во однос на периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата.

Varkeeta и сор. (1998) утврдиле дека ризикот за појава на која било форма на мастит е поголем во првите неколку денови по телењето. Според овие автори, 30% од сите случаи се појавуваат во првите 14 дена од лактацијата. Houben и сор. (1993) изнесуваат дека ризикот од заболување на кравите од мастит во прва, втора и трета лактација изнесува 33%, 23%, односно 20%. Според Pankey и сор. (1991), 13 до 39% од јуниците пред телење имаат инфицирани млечни жлезди, додека според други автори тој процент е многу повисок, дури до 90% (Trinidad и сор., 1990). Имуносупресивноста, нормално присутна во текот на преодниот период од стелност кон лактација како резултат на бројните физиолошки промени, придонесува за зголемена инциденција на мастит во текот на рана лактација (Mehrzaд и сор., 2001). Зголемената појава на мастит во раната лактација се поврзува и со појавата на инфекции на млечната жлезда во текот на сувостојниот период (Трајчев и сор., 1997). Големиот процент на инфекции на млечната жлезда во текот на сувостојниот период резултира со појава на одредена форма на мастит во првите 75 дена по телењето на кравите (Radostits и сор., 2007).

Rajala и сор. (1999) изнесуваат податок за високи 25% од случаите на мастит кои се појавуваат во првите 5 дена по телењето. Особено ризични за појавата на нови инфекции на млечната жлезда со стрептококи од околината се последните 7 до 10

дена пред телење и раната лактација. Во контекст на ова се и истражувањата на Shpigel и сор. (1998), според кои 51,4% од сите случаи на интрамамарни инфекции се појавуваат во раниот период на лактацијата.

Suriyasatharorn и сор. (2000) констатирале дека постои поголем статистички значаен ризик за појава на мастит во раниот и средниот период од лактацијата, во споредба со поодминатата лактација, кој го поврзуваат со патогените микроорганизми од околината. При анализата на добиените резултати, треба да се има предвид и возраста на кравите, бидејќи со зголемување на возраста се зголемува и ризикот за појава на мастит.

Врз основа на добиените резултати од нашите истражувања, најголем процент од инфекциите на млечната жлезда во периодот на рана лактација беа предизвикани од контагиозни патогени микроорганизми. Сепак, не беше мал и процентот на инфекции предизвикани од патогени микроорганизми од околината, пред сè од *Enterococcus spp.* и *Escherichia coli*.

Од добиените резултати за просечната млечност на кравите, забележливо е дека популацијата молзни крави која во текот на опсервираниот период заболела од случај на мастит има повисока просечна млечност при првата контрола на млеко во споредба со здравата група, КМТ(-) крави. Подоцна, при втората и третата контрола на млеко се забележува тренд на континуирано опаѓање на млечноста, при што просечната млечност на кравите заболени од мастит значително опаѓа во споредба со просечната млечност на КМТ(-) крави. Независно од здравствениот статус на млечната жлезда, кај целата испитувана популација млечни крави, просечната млечност изнесуваше $28,76 \pm 0,572$ kg при првата, $28,79 \pm 0,472$ kg при втората и $28,15 \pm 0,485$ kg при третата контрола на млеко.

Според Grohn и сор. (2003), високомлечните крави заболуваат од барем една или повеќе болести во периодот по телењето. Пред сè, овие крави се приемливи на маститот и заостанување на постелката (Sordillo и Aitken 2009; Chapinal и сор. 2012). Повеќе автори зголемената инциденција на мастит во почетокот на лактацијата ја објаснуваат со позитивната поврзност меѓу појавата на заболувањето и зголемената млечност на почетокот на лактација (Wu и сор., 2008). Miller и сор. (1984) утврдиле дека дека кравите со мастит, кај кои во млекото биле изолирани главните причинители на мастит, во првите два месеца од лактацијата имале поголема продукција на млеко, а еден месец подоцна помала. И други автори со нивните

истражувања потврдуваат дека кравите кои заболеле од одредена форма на мастит, претходно имале поголема млечност во споредба со здравите крави во стадото (Hagnestam и сор., 2007; Ericsson и сор., 2009). Според Kosak (2006), постои сигнификантно намалување на млечноста една седмица пред дијагнозата на маститот, седмицата кога е дијагностициран маститот и една седмица потоа. Авторот истакнува дека зголемената продукција на млеко како резултат на генетската селекција ја зголемува приемливоста на животните спрема маститот. Наспроти овие сознанија, Ouweltjes и сор. (2007), истакнуваат дека високата продукција на млеко, сама за себе, не претставува ризик-фактор за здравствената состојба на млечната жлезда.

Покрај многубројните негативни влијанија кои ги има маститот, загубите во продукцијата и квалитетот на млекото имаат најголемо економско значење. Nakov и сор. (2012) заклучиле дека маститот има изразено негативно влијание врз млекопродукцијата на кравите и постои статистички значајна разлика во млечноста на здравите крави и кравите заболени од клинички мастит. Маститот има продолжено негативно дејство на млечноста, па појавата на мастит во раната лактација влијае врз понатамошната млекопродукцијата (Valde и сор., 2004; Hagnestam и сор., 2007). Ефектот на маститот врз млечноста значајно зависи од видот на патогениот агенс, периодот од лактацијата, периодот од појавата на клиничкиот мастит до денот кога е направена контрола на млекото и некои други фактори (Seegers и сор., 2003).

Заради големите разлики кои постојат меѓу патогените микроорганизми кои предизвикуваат мастит во однос на патогенезата на воспалителниот процес, логично би било да се очекува загубите во млеко да варираат меѓу интрамамарните инфекции предизвикани од различни причинители (Schukken и сор., 2011). Освен тоа, појавата на мастит во раниот период од лактацијата го зголемува ризикот за нови случаи на мастит во текот на лактацијата, појава на зголемен број соматски клетки во млекото и намалување во млекопродукцијата во остатокот од лактацијата, но и во следните лактации (De Vliegher и сор., 2004).

Кравите со висока продукција на млеко имаат поголем ризик да влезат во фаза на високо ниво на оксидативен стрес во споредба со нископродуктивните животни. Со зголемување на млечноста состојбата се влошува (Castillo и сор., 2005). Воспалителните процеси во млечната жлезда и намалената антиоксидативна заштита

на жлезденото ткиво доведуваат до оштетување на лактоцитите и трајно нарушување на нивната функција. Ова на крај резултира со намалување на продукцијата на млеко (Zhao и Lacasse, 2008). Kolb и Seehawer (2000) истакнуваат дека потребата во кислород на кравите со висока продукција на млеко е за двапати поголема во однос на помалку млечните крави. Ова резултира со поголема внатрешна продукција на реактивни оксидативни метаболити. Според Cortinhas и сор. (2010), акумулацијата на слободни радикали во млечната жлезда настанува како резултат на фагоцитозата на патогените микроорганизми во млечната жлезда кои предизвикуваат мастит, што може да резултира со оштетување на епителните клетки и намалување на секрецијата на млеко. Млекото со зголемен број соматски клетки е поподложно на процесите на липолиза и пероксидација (Petrovski и Stefanov, 2006).

Повеќе истражувања укажуваат на фактот дека оксидативниот стрес претставува значаен фактор кој влијае врз имунолошкиот и воспалителниот одговор на организмот, со што се зголемува ризикот за здравствени нарушувања во периодот на преминување од гестација кон лактација (Wilde, 2006; Sordillo и Aitken, 2008). Ronchi и сор. (2000) и Bernabucci и сор. (2002) истакнуваат дека во периодот на преминување од гестација кон лактација настануваат динамички промени и нарушувања во оксидативниот статус на млечните крави. Други истражувања укажуваат на значајни промени во антиоксидативниот потенцијал и про-оксидативниот статус на млечните крави во преодниот период (Bernabucci и сор., 2005; Castillo и сор., 2005; Sordillo и сор., 2007). Метаболичкиот стрес како резултат на зголемената млекопродукцијата на млечните крави е тесно поврзана со зголемената продукција на РОМ и со други клинички релевантни патолошки состојби (Kankofer, 2002). Некои понови студии го подржуваат концептот дека оксидативниот стрес ја зголемува приемливоста на кравите кон заболувања и ја потенцираат улогата на антиоксидансите при различни физиолошки состојби кај преживните животни (Bernabucci и сор., 2005; Castillo и сор., 2005; Sordillo и Aitken, 2009; Pedernera и сор., 2010; Celi и сор., 2011a, Celi и сор., 2012; Sharma и сор., 2011; Tanaka и сор., 2011).

Периодите пред телење и по телење кога се земани примероците од крв и од млеко, покажаа статистички значајно влијание ($p < 0,001$) на активноста на ензимите SOD и GPx во крвниот серум на кравите, но не и на активноста на ензимите во млечниот серум. Генерално, постоеше статистички значајна разлика во

специфичната активност на антиоксидативните ензими меѓу периодот 21. ден пред телење и периодот на рана лактација.

Во текот на истражувањата, специфичната активност на SOD во крвниот серум, независно во која група припаѓаат кравите, пред телење беше пониска ($24,20 \pm 2,319$ mU/mg протеини) во споредба со периодот од почетокот на лактацијата до 42. ден во лактација ($26,77 \pm 2,201$ mU/mg протеини до $43,94 \pm 3,864$ mU/mg протеини).

Специфичната активност на селено зависната GPx во крвниот серум, независно во која група припаѓаат кравите, пред телење беше пониска ($251,79 \pm 9,363$ mU/mg протеини) во споредба со периодот од почетокот на лактацијата до 42. ден во лактација ($319,40 \pm 14,307$ mU/mg протеини до $372,45 \pm 17,533$ mU/mg протеини).

Зголемената активност на антиоксидативните ензими во периодот по телење е сигурен индикатор дека животните со започнување на лактацијата влегуваат во состојба на оксидативен стрес, што понатаму ги прави поприемливи на здравствени и метаболички нарушувања. Возраста на кравите, односно лактацијата по ред, не покажаа статистички значајно влијание на специфичната активност на SOD и GPx во крвниот и млечниот серум на испитуваните крави. Единствено во моделот за влијанието на факторите на специфичната активност на GPx во млечниот серум на кравите, млечноста на кравите во тест денот при месечните контроли на млеко покажаа статистичка значајност на ниво $p < 0,05$.

Слични резултати во однос на динамиката во промените во активноста на овие ензими изнесуваат повеќе автори (Kankofer и сор., 2010a; Sharma и сор., 2011; Turk и сор., 2013). Според нивните истражувања, активноста на антиоксидативните ензими во крвта на кравите во периодот по телење била пониска споредено со периодот пред телење и периодот во лактација, што би можело негативно да влијае на функцијата на неутрофилите и да го зголеми ризикот кравите да заболат од мастит.

Festila и сор. (2012), исто така, утврдиле зголемена активност на GPx во крвта на млечните крави во текот на гестацијата ($81,3 \pm 3,91$ U/g Hb) и намалување на активноста со почетокот на лактацијата ($79,21 \pm 3,93$ U/g Hb) и подоцна во текот на лактацијата ($73,29 \pm 2,60$ U/g Hb). Во однос на активноста на ензимот SOD во крвниот серум на кравите, забележан е истиот тренд, односно неговата активност пред телење изнесувала $1878,61 \pm 88,59$ U/g Hb, со почетокот на лактацијата се намалила

на $1786,52 \pm 76,36$ U/g Hb, а подоцна нивната активност повторно се зголемила ($1828,52 \pm 107,94$ U/g Hb).

Maurya и сор. (2014) утврдиле активност на плазматската SOD од $127,25 \pm 1,37$ U/L на 60 дена пред телење и $170,86 \pm 0,76$ U/L на денот на телење. По овој период активноста се намалувала сè до 60. ден во лактација. Слична динамика имала и активноста на GPx во плазмата, која на 60 дена пред телење изнесувала $61,76 \pm 5,85$ nmol/min/ml, на денот на телење изнесувала $146,02 \pm 6,66$ nmol/min/ml, а потоа активноста на ензимот имала тренд на намалување сè до 60. ден во лактација, кога изнесувала $48,60 \pm 2,60$ nmol/min/ml.

Adela и сор. (2006) изнесуваат податоци за активноста на SOD во еритроцитите во текот на раната лактација кај млечните крави, кога изнесувала 1365 U/g Hb во првата недела во лактацијата, 1890 U/g Hb во втората недела, 2290 U/g Hb во третата недела, 1896 U/g Hb во четвртата недела и 1905 U/g Hb во петтата недела во лактацијата. За истиот период, активноста на GPx во еритроцитите била 129 U/g Hb во првата недела во лактација, зголемувајќи се постепено до 166 U/g Hb во петтата недела во лактација.

Намалената активност на антиоксидативните ензими во текот на лактацијата се поврзува со појавата на оксидативен стрес и трошење на SOD и GPx за неутрализација на липидните пероксиди во плазмата. Ова се потврдува и во истражувањата во кои се утврдени повисоки концентрации на POM веднаш по телењето, кога активноста на SOD и GPx во крвта започнува да се намалува. Повторното зголемување на активноста на овие ензими во периодот од 3 до 4 недели по телењето претставува индикација дека кравите страдаат од оксидативен стрес во текот на постпарталниот период. Кога активноста на GPx во крвта се намалува, организмот ги активира алтернативните патишта за заштита на оксидативната хомеостаза преку активирање на ензимот каталаза (Droge, 2002). Понатаму, се вклучуваат и останатите антиоксидативни механизми со цел зачувување на хомеостазата во организмот (Lykkesfeldt и Svendsen, 2007).

Според Wullepit и сор. (2009), вкупниот антиоксидативен капацитет на плазмата, изразен преку способноста на плазмата за редуцирање на железото е понизок две недели пред телење во споредба со четвртата и осмата недела по телење. Истите автори утврдиле статистички значајно поголеми вредности за активноста на

GPx во плазмата 4 недели по телење, во споредба со периодот 2 недели пред телење. До истите заклучоци дошле и други автори (Celi и сор., 2010; Sharma и сор., 2011).

Концентрацијата на липидните пероксиди и биомаркерите на липидната пероксидација во плазмата, кои се индикатор за ран стадиум на пероксидативно оштетување на клетките и ткивата, статистички значајно се зголемуваат во периодот од телење и првите три недели во лактација во споредба со периодот пред телење (Castillo и сор., 2005; Sordillo и сор., 2007), проследени со намалена концентрација на антиоксиданси (Bouwstra и сор. 2010) и намалена активност на антиоксидативните ензими во крвта (Gaal и сор. 2006). Овие, но и други автори, со сигурност потврдуваат дека млечните крави страдаат од нарушена редокс-хомеостаза во раниот постпартален период што укажува на појава на одредено ниво на оксидативен стрес и липидна пероксидација (Bionaz и сор. 2007). Wachter и сор. (1999) забележале намалување на антиоксидативната активност со напредување на лактацијата, најверојатно заради трошењето на антиоксидансите растворливи во масти кои се излучуваат преку млекото.

Во истражувањата на Bernabucci и сор. (2005), кравите пред телење имале зголемена активност на SOD и GPx во плазмата, а намалена активност на SOD и GPx во еритроцитите и намалена концентрација на POM во плазмата. По телењето, кравите имале намалена активност на SOD во еритроцитите и плазмата, а зголемена концентрација на POM, TBARS (тиобарбитуратни реактивни супстанции кои се индикатор за липидната пероксидација) и зголемена активност на GPx во плазмата. Активноста на SOD во еритроцитите прогресивно се зголемувала во последните три недели од гравидноста, потоа една недела пред телењето се намалила на ниво на активност пред засушување на кравите, додека по телењето активноста се намалила и под ова ниво. Според нив, SOD претставува прва одбранбена линија од прооксидативните супстанции и затоа неговата активност брзо се троши за дисмутација на истите, што предизвикува забрзана акумулација на водороден пероксид, кој претставува супстрат за активноста на GPx.

Sharma и сор. (2011) информираат за зголемена активност на SOD во крвта 3 недели пред телење и намалување на активноста на ензимот по телењето. Зголемената активност на SOD пред телење, овие автори ја поврзуваат со метаболичката адаптација за одржување на редокс-хомеостазата во организмот. Меѓутоа, активноста на SOD во млекото не зависела од возраста на кравите, односно

лактацијата по ред, периодот во лактација и бројот на соматски клетки во млекото (Przybylska и сop., 2007). Активноста на ензимот варираше меѓу кравите и зависно од расата (Lindmark-Mansson и Akesson, 2000). Stefanon и сop. (2005) укажуваат на зголемена активност на SOD и GPx во крвта по телењето. Спротивно, Gaal и сop. (2006) не забележале промени во вкупниот антиоксидативен капацитет на плазмата и активноста на GPx во еритроцитите во кравите во времето на телење и постпарталниот период. Меѓутоа, активноста на SOD во еритроцитите била намалена.

Sordillo и сop. (2007) забележале дека по телењето на кравите, соодносот редуциран/оксидиран глутатион во крвта се намалува, што го поврзале со зголемената липидна пероксидација. Истовремено, овие автори евидентирале и зголемена активност на GPx во крвта, укажувајќи на неговата цитопротективна улога. Меѓутоа, авторите не биле сигурни дали зголемената активност на ензимот е доволна за превенирање на оксидативното оштетување на липидите. Според нив, активноста на GPx од еритроцитите се однесува различно од другите антиоксиданси. Имено, таа се намалила во периодот 4 дена пред телење до 11 дена по телењето.

Според Kankofer и сop. (2010), во постпарталниот период доаѓа до драстични промени во активноста на GPx во млечната жлезда. Најниската активност била утврдена во периодот веднаш по телењето со тенденција на постојано зголемување во текот на лактацијата. Спротивно, Hojo (1986) истакнува дека активноста на GPx во млекото постојано се намалува во текот на лактацијата.

Согласно добиените резултати во нашите истражувања, со почетокот на лактацијата беше евидентирана зголемена активност на антиоксидативните ензими. Ова најверојатно се должи на забрзаната продукција на POM, како резултат на оксидативните и воспалителните процеси, но и на присуството на патогени микроорганизми во млекото. Активноста на антиоксидативните механизми, не можејќи да го задоволи потребниот капацитет, започнува да се намалува, и затоа организмот навлегува во фаза на оксидативен стрес.

Albera и Kankofer, (2010) докажале дека постојат динамички промени во антиоксидативниот профил на крвта, колостралното млеко и млекото, што претставува соодветен одговор на организмот да ја воспостави нарушената редокс рамнотежа на почетокот од лактацијата. Присуството на активните антиоксидативни супстанции во колостралното млеко и млекото ја штитат млечната жлезда и

новороденото теле од оксидативен стрес. Овие автори утврдиле различна динамика на промените во редокс рамнотежата меѓу кравите во прва и втора лактација, со што докажале дека кравите во различна лактација различно реагираат на метаболичките промени. Вкупниот антиоксидативен капацитет на плазмата, колостралното млеко и млекото како и активноста на GPx во плазмата и во колостралното млеко и млекото кај кравите во прва и втора лактација биле најниски веднаш по телењето, но значајно се зголемиле по 48 часа. Највисоки вредности за овие параметри биле измерени во млекото 6. ден во лактацијата, меѓутоа 12. ден во лактацијата вредноста на вкупниот антиоксидативен капацитет значајно се намалила. Постоела висока корелација во однос на временските точки кога била одредувана вредноста на вкупниот антиоксидативен капацитет во колостралното млеко и млекото, но не постоела корелација меѓу вредностите на крвната плазма и колостралното млеко и млекото. Вредностите за вкупниот антиоксидативен капацитет и активноста на GPx биле пониски кај кравите во втората лактација во споредба со првотелките.

Сепак, за нивото на оксидативен стрес во текот на гестацијата и периодот по породувањето, постојат и контрадикторни резултати, не само во ветеринарната медицина, туку и во истражувањата во хуманата медицина. Повеќето од нив укажуваат на тоа дека организмот по породувањето манифестира оксидативен стрес (Djordjevic и сор., 2004; Castillo и сор., 2005). Но, има и такви истражувања според кои липидната пероксидација во текот на гестацијата и породувањето била намалена (Naziroglu и сор., 2004). Понатаму, некои истражувања наведуваат дека во текот на нормалната гестација настанува зголемување на активноста на антиоксидативните ензими (Djordjevic и сор., 2004), а други дека не настанува промена во антиоксидативниот статус на организмот или пак настанува намалување во активноста на антиоксидативните ензими (Naziroglu и сор., 2004). Повеќето автори се согласуваат дека промените во антиоксидативниот статус најверојатно зависи од концентрацијата и продукцијата на POM во организмот. Во текот на средниот и доцниот период во лактацијата, концентрацијата на неензимските антиоксидативни супстанции и активноста на ензимските антиоксиданси се зголемува, што укажува на зголемената потрошувачка на антиоксидативните системи во текот на раната лактација. Ова е пред сè заради зголемената протеинска и липидна пероксидација, кога всушност и организмот се наоѓа во одредено ниво на оксидативен стрес (Cigliano и сор., 2014). Зголемената продукција на POM и состојбата на оксидативен

стрес ги нарушува нормалните физиолошки функции на животните што на крај резултира со појава на здравствени нарушувања, особено во периодот на лактација кај млечните крави (Lykkesfeldt и Svendsen, 2007; Zhao и Lacasse, 2008). Дополнително, редокс-статусот на колостралното млеко и млекото влијаат врз оксидативниот статус на новородените животни и нивната предиспонираност кон метаболички и здравствени нарушувања (Abuelo и сор., 2013).

Gaal и сор. (2006) информираат дека новородените телиња добро се подготвени за запирање на оксидативниот стрес и стресот предизвикан од актот на телење има минорен ефект врз антиоксидативниот систем на млечните крави.

Од претходната дискусија може да се заклучи дека појавата на оксидативен стрес во периодот на рана лактација не може да се разгледува одвоено, само од аспект на здравствените нарушувања на млечната жлезда, туку овде треба да се земат предвид и останатите метаболички промени, што можеби е една од причините во текот на истражувањето да добиеме слика на динамички промени во однос на антиоксидативниот ензимски статус на кравите во периодот пред телење и рана лактација.

6.6. ВЛИЈАНИЕ НА СЕЗОНАТА ВРЗ ЗДРАВСТВЕНИТЕ НАРУШУВАЊА НА МЛЕЧНАТА ЖЛЕЗДА И ВРЗ АКТИВНОСТА НА АНТИОКСИДАТИВНИТЕ ЕНЗИМИ

Преваленцијата на здравствените нарушувања на млечната жлезда во текот на двегодишниот период на истражување беше највисока во сезоните зима (54,55%) во првата година и пролет (54,29%) во втората година, а најниска во сезоната пролет во првата година на истражување (25,00%). Највисока преваленција на нарушена секреција на млечната жлезда (36,36%) беше евидентирана во зима, во првата година на истражување, а најниска (14,81%) во втората година, исто така во зима. Преваленцијата на интрамамарните инфекции беше највисока во лето во првата година на истражување (23,08%), како и во сезоната есен во втората година на истражување (23,08%), а најниска во сезоната пролет во првата година на истражување (8,33%). Највисока преваленција на интрамамарни инфекции од КМТ(+) крави беше евидентирана во сезоните есен и зима (60,00%), во втората година на истражување, додека двојно пониска преваленција беше утврдена кај

кравите отелени во сезоните пролет, есен и зима во првата година на истражување (33,33%).

Генерално, инфекциите на млечната жлезда предизвикани од главните патогени микроорганизми, *Streptococcus agalactiae* и *Staphylococcus aureus*, имаат поголема преваленција кај кравите отелени во сезоните пролет и лето, додека инфекциите предизвикани од патогени микроорганизми од околината (*Escherichia coli* и *Enterococcus spp.*) беа попревалентни во сезоната есен.

Климатските карактеристики во Република Македонија ги прават сезоните пролет и есен да бидат периоди од годината со најмногу врнежи, што е во согласност со литературните сознанија за влијанието на зголемените врнежи и влажноста на воздухот врз појавата на интрамамарните инфекции (Rahman и сор., 2009). Високата преваленција на нарушена секреција и интрамамарни инфекции во текот на врнежливите сезони од годината е во корелација со слабата хигиена и санитација во фармите. Имено, зголемената влажност во објектите за сместување и во постелката, создава поволни услови за раст и размножување на многу микроорганизми, пред сè од околината, кои се потенцијани причинители на мастит кај млечните крави.

Waage и сор. (1999) откриле дека релативниот сооднос на некои причинители на мастит значајно зависи од сезоната. Така на пример, *Staphylococcus aureus* и *Actinomyces pyogenes* најчесто биле изолирани во пробите од млеко од четвртинките на млечната жлезда заболени од мастит во доцна есен и рана зима, наспроти коагулаза негативните стафилококи, кои биле најмалку присутни. Според други истражувања, преваленцијата на клиничкиот мастит предизвикан од *Escherichia coli* е највисока во сезоните пролет и лето, додека *Streptococcus uberis* од заболените млечни жлезди на кравите најчесто бил изолиран во сезоните есен и зима (Smith и сор., 1985).

Постојат повеќе литературни сознанија за влијанието на сезоната на телење врз појавата на мастит. Во истражувањата направени во климатските услови на Република Македонија, сезоната во годината кога се телат кравите и кога започнува лактацијата претставува ризик-фактор со високо статистички значајно влијание ($p < 0,001$) врз појавата на клинички мастит во стадата (Наков и Трајцев, 2012). Ова го потврдуваат и истражувањата на Berry и Meaney, (2006), според кои, месецот на телење има високо статистички значајно влијание врз појавата на мастит во стадата

млечни крави. Според други автори, не постои сигнификантно влијание на сезоната на телење врз појавата на мастит (Bunch и сор., 1984).

Во истражувањата на Wolf и сор. (2009), статистички значајна разлика меѓу сезоните на телење во однос на појавата на клиничкиот мастит била забележана меѓу периодот мај-октомври и периодот ноември-април во следната година. Инаку, најголемиот број од авторите кои ја истражувале оваа проблематика истакнуваат дека влијанието на сезоната на телење врз појавата на клиничкиот мастит пред сè се должи на присутната микрофлора која ја контаминира постелката во моментот на телење, а што е поврзано со микроклиматските услови во објектот и непосредната околина.

Во однос на сезоните во годините на телење, постоеше статистички значајна разлика во специфичната активност на SOD и GPx во крвниот и млечниот серум, со различна динамика, најверојатно зависно од условите во надворешната средина. Забележителна беше зголемената активност на антиоксидативните ензими во лето во однос на другите сезони. Сезоните во годините на телење покажаа статистички значајно влијание ($p < 0,001$) на активноста на SOD и GPx во крвниот и млечниот серум на кравите во испитуваната популација.

Во истражувањата направени кај млечни крави се потврдува улогата на топлотниот стрес во манифестирањето на оксидативниот стрес во преодниот период на стелност и почетокот на лактацијата (Bernabucci и сор., 2002). Според овие автори, кравите отелени во лето имаат повисок степен на липидна пероксидација и зголемена активност на SOD и GPx во еритроцитите во споредба со кравите отелени во сезоната пролет. Меѓутоа, топлотниот стрес и сезоната не влијаеле врз концентрацијата на оксидативните маркери во плазмата. Зголемената активност на GPx во плазмата претставува компензаторен заштитен механизам на клетките од оксидативниот стрес. Истовремено, концентрацијата на витаминот E во плазмата била најниска во лето што се објаснува со директната реакција на витаминот E со РОМ со цел нивна неутрализација. Дополнително, Такака и сор. (2011), следејќи ги промените во активноста на маркерите за оксидативен стрес во крвната плазма на кравите одгледувани во топли климатски услови, 5 дена пред телење до 10. ден по телење, заклучиле дека кравите по телење влегуваат во состојба на оксидативен стрес која се влошува кога животните се држани во услови на топлотен стрес. Според нив, топлотниот стрес ја поттикнува синтезата на слободните радикали.

Интересна била констатацијата дека активноста на антиоксидативните ензими била правопрпорционално поврзана со концентрацијата на РОМ во крвта.

Според Di Tana и сор. (2006), топлите амбиентални услови имаат посилен ефект на оксидативните маркери отколку исхраната на животните. Дополнително, топлотниот стрес кај животните негативно влијае врз продуктивните и репродуктивните перформанси, метаболичкиот и здравствениот статус и имунолошкиот одговор, што придонесува за огромни економски загуби во сточарството (Bernabucci и сор., 2010).

7. ЗАКЛУЧОК

Врз основа на добиените резултати од направените испитувања за поврзаноста на оксидативниот стрес и појавата на мастит кај кравите, може да се заклучи следново:

- Преваленцијата на нарушената секреција на млечната жлезда изнесуваше 23,70%, а на интрамамарните инфекции 19,43%, или преваленцијата на здравствените нарушувања изнесуваше вкупно 43,13%.
- Преваленцијата на нарушената секреција на млечната жлезда во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата изнесуваше 16,59%, на интрамамарните инфекции 11,37%, или вкупната преваленција на здравствените нарушувања на млечната жлезда во овој период изнесуваше 27,96%. Преваленцијата на нарушената секреција на млечната жлезда во периодот во периодот од 22. ден до 42. ден во лактацијата изнесуваше 14,22%, на интрамамарните инфекции 13,27%, или вкупната преваленција на здравствените нарушувања на млечната жлезда во овој период изнесуваше 27,49%.
- Од вкупниот број на КМТ(+) крави, интрамамарна инфекција беше утврдена кај 45,05% крави, независно од периодот во лактација, кај 40,68% крави во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата и кај 48,28% крави во периодот од 22. ден до 42. ден во лактацијата.
- Во однос на сезоната на телење, највисока преваленција на нарушена секреција на млечната жлезда беше евидентирана во сезоната зима во првата година на истражување (36,36%), а најниска во втората година, исто така во сезоната зима (14,81%). Највисока преваленција на интрамамарните инфекции беше евидентирана во сезоната лето во првата година и сезоната есен во втората година на истражување (23,08%), а најниска во сезоната пролет во првата година на истражување (8,33%).
- Во однос на сезоната на телење, највисока преваленција на интрамамарни инфекции од вкупниот број на КМТ(+) крави беше регистрирана во сезоните есен и зима во втората година (60,00%), а најниска во сезоните пролет, есен и зима во првата година на истражување (33,33%).

- Преваленцијата на здравствените нарушувања на четвртинките на млечната жлезда во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата изнесуваше 9,36%, од кои 5,33% со нарушена секреција, а 4,03% со интрамамарна инфекција. Во периодот од 22. до 42. ден во лактацијата преваленцијата на здравствените нарушувања на четвртинките на млечната жлезда изнесуваше 9,83%, од кои 5,45% со нарушена секреција, а 4,38% со интрамамарна инфекција.
- Преваленцијата на инфекциите на четвртинките на млечната жлезда од вкупниот број на КМТ(+) четвртинки изнесуваше 43,04% во периодот од почетокот на лактацијата до 21. ден во лактацијата, а 44,58% во периодот од 22. ден до 42. ден во лактацијата.
- Микробиолошки позитивни од КМТ(+) четвртинки на млечната жлезда беа 43,83%. Од нив, *Streptococcus agalactiae* беше изолиран во 19,14% случаи, *Enterococcus spp.* во 8,02%, *Candida non-albicans* во 6,79%, *Staphylococcus aureus* во 6,17%, *Escherichia coli* во 1,85%, *Aspergillus niger* во 1,23% и *Pseudomonas aeruginosa* во 0,62% случаи.
- Од изолираните причинители на мастит, *Streptococcus agalactiae* покажа осетливост на сите антимикуробни средства, со исклучок на *Co-trimoxazol*. Спротивно, *Staphylococcus aureus* покажа резистентност кон антимикуробните средства. Останатите изолирани микроорганизми покажаа осетливост на сите антимикуробни средства, со одредени исклучоци.
- Статистички значајно влијание на специфичната активност на SOD во крвниот серум на кравите, покажа влијанието на сезоната на телење и периодите пред и по телење ($p < 0,001$). Лактацијата по ред на кравите и здравствените нарушувања на млечната жлезда не покажаа статистички значајно влијание во однос на активноста на SOD во крвниот серум на кравите. Статистички значајно влијание на специфичната активност на SOD во млечниот серум на кравите покажаа сезоните во годините на телење ($p < 0,001$), додека влијанието на здравствениот статус на млечната жлезда се приближуваше до статистичка значајност на ниво $p < 0,05$ ($p = 0,058$). Останатите фиксни фактори не покажаа статистичка значајно влијание на активноста на SOD во млечниот серум.

- Статистички значајно влијание на специфичната активност на GPx во крвниот серум на кравите на ниво $p < 0,001$ покажаа сезоната на телење, здравствениот статус на млечната жлезда, периодите пред и по телење и активноста на SOD во крвниот серум на кравите. Лактацијата по ред на кравите не покажа статистички значајно влијание. Статистички значајно влијание на специфичната активност на GPx во млечниот серум покажаа сезоната на телење ($p < 0,001$). Здравствениот статус на млечната жлезда и млечноста на кравите во тест денот при првата и втората контрола на млеко покажаа статистичка значајност на ниво $p < 0,05$. Периодот во лактација кога се земани примероците од млеко и лактацијата по ред на кравите не покажаа статистички значајно влијание.
- Активноста на ензимот GPx во крвниот и млечниот серум на кравите може да биде предиктивна дијагностичка алатка за откривање на нарушувањето на здравствениот статус на млечната жлезда во периодот на рана лактација.
- Оксидативниот стрес има значајна улога во нарушувањата на здравствениот статус на млечната жлезда кај кравите. Таквиот заклучок наметнува употреба на антиоксидансите во храната наменета за исхрана на млечните крави како превентивна мерка за здрава млечна жлезда и воопшто за здравјето на кравите, посебно во периодот на доцната гестација и раната лактација.
- Во понатамошните истражувања треба да бидат опфатени повеќе биомаркери за оксидативен стрес и повеќе антиоксидативни механизми, со цел пресметување на оксидативниот индекс како најрелевантен параметар кој го отсликува оксидативниот статус на животното.

8. ЛИТЕРАТУРА

1. Abdel-Rady, A. and Sayed, M. (2009). Epidemiological studies on subclinical mastitis in dairy cows in Assiut Governorate. *Veterinary World* 2, pg. 373-380.
2. Abera, M., Habte, T., Aragaw, K., Asmare, K. and Sheferaw, D. (2012). Major causes of mastitis and associated risk factors in smallholder dairy farms in and around Hawassa, Southern Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production* 44, pg. 1175–1179.
3. Abrahmsén, M., Persson, Y., Kanyima, B.M. and Båge, R. (2013). Prevalence of subclinical mastitis in dairy farms in urban and peri-urban areas of Kampala, Uganda. *Trop Anim Health Prod.* DOI 10.1007/s11250-013-0455-7.
4. Abuelo, A., Perez-Santos, M., Hernandez, J., Castillo, C. (2013). Effect of colostrum redox balance on the oxidative status of calves during the first 3 months of life and the relationship with passive immune acquisition. *The Veterinary Journal*, 199, pg. 295-299.
5. Abunna, F., Fufa, F., Megersa, B. and Regassa, A. (2013). Bovine Mastitis: Prevalence, Risk Factors and Bacterial Isolation in Small-Holder Dairy Farms in Addis Ababa City, Ethiopia *Global Veterinaria* 10 (6): pg. 647-652.
6. Adela, P., Zinveliu, D., Pop, R.A., Andrei, S., E., Kiss. (2006). Antioxidant status in dairy cows during lactation. *Buletin USAMV-CN*, 63, pg. 130-135.
7. Adkinson, R.W., Ingawa, K.H., Blouin, D.C., Nickerson, S.C. (1993). Distribution of clinical mastitis among quarters of the bovine udder. *J. Dairy Sci.* 76, pg. 3453-3459.
8. Agarwal, A. and Prabhakaran, S.A. (2005). Mechanism, measurement and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Ind. J. Exp. Biol.*, 43: pg. 963-974.
9. Albera, E. and Kankofer, M. (2009). Antioxidants in colostrums and milk of sows and cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 44, pg. 606-611.
10. Albera, E. and Kankofer, M. (2010). The Comparison of Antioxidative/Oxidative Profile in Colostrum, Milk and Blood of Early Post-Partum Cows During their First and Second Lactation *Reprod Dom Anim* 45, pg. 417-425.
11. Allison, R.D. and Laven, R.A. (2000). Effect of vitamin E supplementation on the health and fertility of dairy cows: a review. *Vet. Rec.* 147, pg. 703–708.
12. Andersson, I., Andersson, H., Christiansson, A., Lindmark-Månsson, H., Oskarsson, M., Persson, Y. and Widell, A. (2011). *System analys Celltal*. Stockholm: Svensk Mjölk Forskning. Nr. 7091.
13. Andrei, S., Pintea, A., Groza, I.S., Bogdan, L., Ciupe, S., Matei, S. (2009). Milk antioxidant enzymes activity in cows with subclinical mastitis, *University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca*, 52 (seria MV): pg. 1-6.
14. Andrei, S., Matei, S., Zinveliu, D., Pintea, A., Bunea, A., Ciupe, S., Groza, I. (2010). Correlations between antioxidant enzymes activity and lipids peroxidation level in blood and milk from cows with subclinical mastitis *veterinary medicine* 67(1), pg. 6-11.
15. Andrei, S., Matei, S., Fit, N., Cernea, C., Ciupe, C., Bogdan, S. and Groza, I.S. (2011). Glutathione peroxidase activity and its relationship with somatic cell count, number of colony forming units and protein content in subclinical mastitis cows milk. *Rom. Biotech. Lett.* Vol. 16, 3: pg. 6209-6217.
16. Ares, J.L., Gomez, M.J., Moreno, A. (1995). Incidence of mastitis in dairy cattle farms of Andalucía. *Advances en Alimentacion y Mejora Animal* 35(6): pg. 21-24.

17. Argqelles, S., Garcia, S., Maldonado, M., Machado, A., Ayala, A. (2004). Do the serum oxidative stress biomarkers provide a reasonable index of the general oxidative stress status? *Biochimica et Biophysica Acta* 1674, pg. 251-259.
18. Asadpour, R., Tayefi-Nasrabadi, H., Moghadam, G.A. and Nofouzi, K. (2008). Correlation between Lactoperoxidase Activity and Somatic Cell Count for Diagnosis Subclinical Mastitis in Early Lactation of Dairy Cows, *J. Animal and Vet. Adv.* 7(7): pg. 777-779.
19. Atakisi, O., Oral, H., Atakisi, E., Merhan, O., Metin Pancarci, S., Ozcan, A., Marasli, S., Polat, B, Colak, A., Kaya, S. (2010). Subclinical mastitis causes alterations in nitric oxide, total oxidant and antioxidant capacity in cow milk. *Research in Veterinary Science* 89, pg. 10-13.
20. Atroshi, F., Parantainen, J., Sankari, S., Osterman, T. (1986). Prostaglandin and glutathione peroxidase in bovine mastitis. *Research in Veterinary Science* 40, pg. 361-366.
21. Avissar, N., Slemmon, J.R., Palmer, I.S. and Cohen, H.J. (1991). Partial sequence of human plasma glutathione peroxidase and immunologic identification of milk glutathione peroxidase as the plasma enzyme. *Journal of Nutrition*, 121, pg. 1243-1249.
22. Ayano, A.A., Hiriko, F., Simyalew, A.M. and Yohannes, A. (2013). Prevalence of subclinical mastitis in lactating cows in selected commercial dairy farms of Holeta district. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health* Vol. 5(3), pg. 67-72.
23. Babaei, H., Mansouri-Najand, L., Molaei, M.M., Kheradmand, A. and Sharifan. M. (2007). Assessment of lactate dehydrogenase, alkaline phosphatase and aspartate aminotransferase activities in cow's milk as an indicator of subclinical mastitis. *Vet. Res. Commun.* 31: pg. 419-425.
24. Bachaya, H.A., Raza, M.A., Murtaza, S, Akbar, I.U.R. (2011). Subclinical bovine mastitis in Muzaffar Garh district of Punjab (Pakistan). *J. Anim. Plant Sci.* 21(1): pg. 16-19.
25. Bandyopadhyay, U., Das, D., Banerjee, K.R. (1999). Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Current Science* 77, 658-665.
26. Barbano, D.M., Ma, Y., Santos, M.V. (2006). Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. *J. Dairy Sci.* 89: pg. 15-19.
27. Barkema, H.W., Schukken, Y.H., Lam, T.J.H.M., Beiboer, M.L., Wilmink, H., Benedictus, G., Brand, A. (1998). Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. *J. Dairy Sci.* 81, pg. 411-419.
28. Bartlett, P.C., Kaneene, J.B., Kirk, J.H., Wilke, M.A., and Marteniuk, J.V. (1986). Development of a computerised dairy herd health data base for epidemiologic research. *Prev. Vet. Med.* 4, pp. 3-14.
29. Bartlett, P.C., Agger, J.F., Houe, H., Lawson, L.G. (2001). Incidence of clinical mastitis in Danish dairy cattle and screening for non-reporting in a passively collected national surveillance system. *Prev. Vet. Med.* 48, pg. 73-83.
30. Basu, S. and Eriksson, M. (2001). Retinol palmitate counteracts oxidative injury during experimental septic shock. *Annals of the Academy of Medicine Singapore* 30, pg. 265-269.
31. Beyer, W.F.Jr. and Fridovich, I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Anal. Biochem.*, 161, pg. 559-566.
32. Bengtsson, B., Ericsson, H.U., Ekman, T., Artursson, K., Nilsson, M., Persson, K. (2009). Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows. *Veterinary Microbiology* 136, pg. 142-149.

33. Benić, M. (2005). Učestalost mastitisa prije i nakon donošenja Pravilnika o kakvoći svježeg sirovog mlijeka. Vet. stn. 36, pg. 233-238.
34. Bernabucci, U., Ronchi, B., Lacetera, N. and Nardone, A. (2002). Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season. J. Dairy Sci. 85: pg. 2173-2179.
35. Bernabucci, U., Ronchi, B., Lacetera, N., Nardone, A. (2005). Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. J. Dairy Sci. 88, pg. 2017-2026.
36. Berry, E. and Hillerton, E. (2001). Monitoring mastitis and maintaining biosecurity. Vet. Rec. 149, pg. 531-532.
37. Berry, D.P. and Meaney, W.J. (2005). Cow factors affecting the risk of clinical mastitis. Irish J. Agric. Food Res. 44, pg. 147-156.
38. Berry, D.P., and Meaney, W.J. (2006). Interdependence and distribution of subclinical mastitis and intramammary infection among udder quarters in dairy cattle. Prev. Vet. Med. 75, pg. 81-91.
39. Bionaz, M., Trevisi, E., Calamari, L., Librandi, F., Ferrai, A. and Bertonni, G. (2007). Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions and liver function in transition dairy cows. Journal of Dairy Science 90, pg. 1740-1750.
40. Blum, J.W., Dosogne, H., Hoeben, D., Vangroenweghe, F., Hammon, H.M., Bruckmaier, R.M., Burvenich, C. (2000). Tumor necrosis factor-alpha and nitrite/nitrate responses during acute mastitis induced by *Escherichia coli* infection and endotoxin in dairy cows, Domest. Anim. Endocrinol. 19, pg. 223-235.
41. Bouchard, L., Blais, S., Desrosiers, C., Zhao, X., Lacasse, P. (1999). Nitric oxide production during endotoxin-induced mastitis in the cow, J. Dairy Sci. 82, pg. 2574-2581.
42. Bouwstra, R.J., Nielen, M., Newbold, J.R., Jansen, E.H.J.M., Jelinek, H.F. and Werven, T.V. (2010). Vitamin E supplementation during the dry period in dairy cattle. Part II: Oxidative stress following vitamin E supplementation may increase clinical mastitis incidence postpartum. J. Dairy Sci. 93(12): pg. 5696-5706.
43. Bradley, A.J., Newton, H., Green, M.J. (2005). Use and interpretation of bacteriology in the diagnosis of bovine intramammary infection. In: Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference. pg. 409-415.
44. Bradley, A.J., Leach, K.A., Breen, J.E., Green, L.E. and Green, M.J. (2007). Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. Vet. Rec. 160: pg. 253-257.
45. Bruzelius, K., Hoac, T., Sundler, R., Onning, G. and Akesson, B. (2007). Occurrence of selenoprotein enzyme activities and mRNA in bovine mammary tissue. J. Dairy Sci. 90: pg. 918-927.
46. Buettner, G.R. (1993). The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. Archives of Biochemistry and Biophysics 300, pg. 535-543.
47. Bunch, K.J., Heneghan, D.J.S., Hibbitt, K.G., and Rowlands, G.J. (1984). Genetic influences on clinical mastitis and its relationship with milk yield, season and stage of lactation. Livest. Prod. Sci. 11, pg. 91-104.
48. Calderon, A., and Rodriguez, V. (2008). Prevalencia de mastitis bovina y su etiologia infecciosa en sistemas especializados en produccion de leche en el altiplano cundiboyacense (Colombia). Rev. Colomb. Cienc. Pecu. 21: pg. 582-589.
49. Castillo, C., Hernandez, J., Bravo, A., Lopez-Alonso, M., Pereira, V., Benedito, J.L. (2005). Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. Vet J. 169: pg. 286-292.

50. Castillo, C., Hernandez, J., Valverde, I., Pereira, V., Sotillo, J., Alonso-Lopez, M., Benedito, J.L. (2006). Plasma malonaldehyde (MDA) and total antioxidant status (TAS) during lactation in dairy cows, *Research in veterinary Science*, 80, pg. 133-139.
51. Celi, P. (2010). The role of oxidative stress in small ruminants' health and production. *R. Bras. Zootec.* 39: pg. 348-363.
52. Celi, P. (2011a). Oxidative stress in ruminants. In: *Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice, Studies in Veterinary Medicine*. (Eds. Mandelker, L. and Vajdovich, P. by Humana Press), 5: pg. 191-231.
53. Celi P. (2011b). Biomarkers of oxidative stress in ruminant medicine. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 33, pg. 233-240.
54. Celi, P., Merlo, M., Barbato, O., Gabai, G. (2012). Relationship between oxidative stress at mating and pregnancy outcome in dairy cows in pasture-based system. *Vet. J.* 193: pg. 498-502.
55. Cerutti PA. (1985). Prooxidant States and Cancer. *Science*, 227: pg. 375–381.
56. Chapinal, N., Leblanc, S.J., Carson, M.E., Leslie, K.E., Godden, S., Capel, M., Santos, J.E., Overton M.W. and Duffield, T.F. (2012). Herd-level association of serum metabolites in the transition period with disease, milk production, and early lactation reproductive performance. *J Dairy Sci* 95, pg. 5676-5682.
57. Char, N.L., Rao, M.R.K. and Rajeswari, K.R. (1993). Clinical mastitis in cows: Bacteriology and antimicrobial activity. *Indian Vet. J.*, 70: pg. 378-379.
58. Charffeddine, N., Alenda, R., Carabano, M.J. (1997). Genetic parameters for somatic cell score within first lactation, and across lactations in Spanish Holstein–Frisian cattle. In: *Proc. 48th Ann. Meet. Eur. Association of Animal Production*, Vienna, Austria, pg. 32-35.
59. Chaquanda, M.G., Larsen, T., Bjerring, M., Inqvartsen, K.L. (2006). L-lactate dehydrogenase and N-acetyl-beta-Dglucosaminidase activities in bovine milk as indicators of non-specific mastitis. *Journal of Dairy Research*, 73, pg. 431-440.
60. Chen, J., Lindmark-Mansson, H. and Akesson, B. (2000). Optimisation of a coupled enzymatic assay of glutathione peroxidase activity in bovine milk and whey. *International Dairy Journal*, 10, pg. 347-351.
61. Cigliano, L., Strazzullo, M., Rossetti, C., Grazioli, G., Auriemma, G., Sarubbi, F., Iannuzzi, C., Iannuzzi, L., Spagnuolo, M.S. (2014). Characterization of blood redox status of early and mid-late lactating dairy cows. *Czech J. Anim. Sci.*, 59, (4): pg. 170-181.
62. Cimen, M.Y., Cimen, O.B., Kacmaz, M., Ozturk, H.S., Yorgancioglu, R., Durak, I. (2000). Oxidant/antioxidant status of the erythrocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.*, 19 (4): pg. 275-277.
63. Colitti, M., Stradaoli, G. and Stefanon, B. (2002). Regulation of mRNA expression of phase I and phase II enzymes in blood following administration of tomato and grape extract in sheep. *proceedings of the 1st European Symposium on bioreactive secondary plants products in veterinary medicine*, 32. Wien, University of Veterinary Medicine.
64. Contreras, A., Corrales, J.C., Sanchez, A. and Sierra, D. (1997). Persistence of subclinical intramammary pathogens in goats throughout lactation. *J. Dairy Sci.* 80: pg. 2815-2819.
65. Contreras, G.A. and Rodriguez, J.M. (2011) Mastitis: comparative etiology and epidemiology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 16: pg. 339-356.
66. Contreras, G.A. and Sordillo, L.M. (2011). Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 34, pg. 281-289.

67. Cordova-Izquierdo, C.G.R.L., Campos, V.M.X., Suarez, S.C., Cordova-Jimenez, C.A., Cordova-Jimenez, M.S. (2010). Efficacy of gonadotropin-releasing factor (GnRH) and antioxidant on the rate of estrous repetition dairy cows. *Aust. J. Basic Applied Sci.*, 408: pg. 1282-1287.
68. Cortinhas, C.S., Botaro, B.G., Sucupira, M.C.A., Renno, F.P., Santos, M.V. (2010). Antioxidant enzymes and somatic cell count in dairy cows fed with organic source of zinc, copper and selenium *Livestock Science* 127, pg. 84-87.
69. Dalir, B.N., Asir-Rezaei, S. and Alidady, N. (2006). Measure of association between selenium status and sepsis in cattle. *Com. Clin. Pathol.*, 15: pg. 149-153.
70. Dantzer, R. and Kelley, K.W. (2007). Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. *Brain. Behav. Immun.* 21(2): pg. 153-160.
71. Debski, B., Picciano, M.F. and Milner, J.A. (1987). Selenium content and distribution of human, cow and goat milk. *Journal of Nutrition*, 117, pg. 1091-1097.
72. Deluyker, H.A., Van Oye, S.N., Boucher, J.F. (2005). Factors affecting cure and somatic cell count after penicillin treatment of subclinical mastitis in lactating cows. *J. Dairy Sci.* 88, pg. 604-614.
73. Detilleux, J.C. (2002). Genetic factors affecting susceptibility of dairy cows to udder pathogens, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 88, pg. 103-110.
74. de Freitas, M. Do A., Magalhães, H. (1990). Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus aureus* isolados de vacas com mastite. *Rev. Microbiol.*, 21: pg. 315-319.
75. De Haan, J.B., Cristiano, F., Iannello, R., Bladier, C., Kelner, M.J., Kola, I. (1996). Elevation in the ratio of Cu/Zn-superoxide dismutase to glutathione peroxidase activity induces features of cellular senescence and this effect is mediated by hydrogen peroxide. *Hum Mol Genet*; 5: pg. 283-292.
76. de Mol, R.M. and Ouweltjes, W. (2001). Detection model for mastitis in cows milked in an automatic milking system. *Prev. Vet. Med.* 49: pg. 71-82.
77. De Vlieghe, S., Laevens, H., Barkema, H.W., Dohoo, I.R., Stryhn, H., Opsomer, G. and de Kruif, A. (2004). Management practices and heifer characteristics associated with early lactation somatic cell count of Belgian dairy heifers. *Journal of Dairy Science* 87, pg. 937-947.
78. Dibner, J.J., Vazquez-Anon, M. and Knight, C.D. (2011). Understanding oxidative balance and its impact on animal performance. Page 1 in *Proc. Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers*, Cornell University, Syracuse, NY.
79. Dingwell, R.T. (2002). Management strategies for the prevention and elimination of intramammary infections in non-lactating dairy cows. Dissertation. University of Guelph. Ontario, Canada.
80. Dingwell, R.T., Leslie, K.E., Schukken, Y.H., Sargeant, J.M., Timms, L.L. (2003). Evaluation of the California mastitis test to detect an intramammary infection with a major pathogen in early lactation dairy cows. *Can Vet J* Volume 44, pg. 413-415.
81. Di Trana, A., Celi, P., Claps, S., Fedele, V., Rubino, R. (2006). The effect of hot season and nutrition on the oxidative status and metabolic profile in dairy goats during mild lactation, *Anim. Sci.*, 82, pg. 717-722
82. Djabri, B., Bareille, N., Beaudeau, F. and Seegers, H. (2002). Quarter Milk Somatic Cell Count in Infected Dairy Cows: a Meta-Analysis. *Vet. Res.* 33(4), pg. 335-357.
83. Djordjevic, A., Spasic, S., Jovanovic-Galovic, A., Djordjevic, R., Grubor-Lajsic, G. (2004). Oxidative stress in diabetic pregnancy: SOD, CAT and GSH-Px activity and lipid peroxidation products. *J Matern-Fetal Neonatal Med* 16: pg. 367-372.
84. Dobbelaar, P., Bouwstra, R.J., Goselink, R.M.A., Jorritsma, R., van den Borne, J., Jansen, E., (2010). Effects of vitamin E supplementation on and the association of

- body condition score with changes in peroxidative biomarkers and antioxidants around calving in dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 93: pg. 3103-3113.
85. Dohoo, L, Smith, R., Andersen, S., Kelton, D.F., Godden, S. (2011). Diagnosing intramammary infections: Evaluation of definitions based on a single milk sample. *J Dairy Sci* 94: pg. 250–261.
 86. Dopfer, D., Barkema, H.W., Lam, T.J.G.M., Schukken, Y.H. and Gaastra, W. (1999). Recurrent clinical mastitis caused by *Escherichia coli* in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 82, pg. 80-85.
 87. Dotan, Y., Lichtenberg, D., Pinchuk, I. (2004). Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress, *Prog. Lipid Res.* 43, pg. 200-227.
 88. Doyle, M.L. (1997). Characterization of binding interactions by isothermal titration calorimetry. *Current Opinion in Biotechnology*, 8, pg. 31-35.
 89. Drackley, J.K. (1999). Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier? *J. Dairy Sci.* 82: pg. 2259-2273.
 90. Drodge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiology Reviews* 82, pg. 47-95.
 91. Ebrahimi, A., Pirali Kheirabadi, K.H., Nikookhah, F. (2007). Antimicrobial susceptibility of environmental bovine mastitis pathogens in west central Iran. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10 (17): pg. 3014-3016.
 92. Elbably, M.A., Emeash H.H. and Asmaa, N.M. (2013). Risk Factors Associated with Mastitis Occurrence in Dairy Herds in Benisuef, Egypt. *World's Vet. J.*, 3(1): pg. 5-10.
 93. Ericsson, U.H., Lindberg, A., Persson, W.K., Ekman, T., Artursson, K., Nilsson-Ost, M., Bengtsson, B. (2009). Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors. *Vet. Microbiol.* 137: pg. 90-97.
 94. Erisir, M., Akar, Y., Gurgoze, S.Y. and Yuksel, M. (2006). Changes in plasma malondialdehyde concentration and some erythrocyte antioxidant enzymes in cows with prolapsus uteri, caesarean section, and retained placenta. *Revue de Med. Vet.*, 157: pg. 80-83.
 95. Erskine, R.J., Eberhart, R.J., Hutchinson, L J., Spencer, S. B. (1987). Herd management and prevalence of mastitis in dairy herds with high and low somatic cell counts. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 190, 11: pg. 1411-1416.
 96. Erskine R.J. (2001). Mastitis Control in Dairy Herds. In Radostits Otto M.: Herd Health Footh Animal Production Medicine, Third Edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, New York, St.Louis, Sydney, Toronto. pg. 397-433.
 97. Ferguson, J.D., Azzaro, G., Gambina, M. and Licitra, G. (2007). Prevalence of Mastitis Pathogens in Ragusa, Sicily, from 2000 to 2006. *J. Dairy Sci.* 90: pg. 5798-5813.
 98. Ferraro, L., Scaramelli, A., Trya, H. (1999). Prevalence of subclinical bovine mastitis in Venezuela and of the California Mastitis Test (CMT). *Facultad Revista cientifica of ciencias veterinarias* 9(2): pg. 81-90.
 99. Ferreiro, L., Ferreiro, C.L.R., Rangel Júnior, J.J. (1985). Mastite bovina na Grande Porto Alegre, RS, Brasil. I - Agentes etiológicos isolados durante o período de 1982-1985. *Arq. Fac.Vet., UFRGS*, 13: pg. 81-88.
 100. Festila, I., Miresan, V., Răducu, C., Cocan, D., Constantinescu, R., Coroiane, A. (2012). Evaluation of oxidative stress in dairy cows through antioxidant enzymes glutathione peroxidase (GPX) and superoxide dismutase (SOD). *Animal Science and Biotechnologies* 69(1-2), pg. 107-110.
 101. Filipovic, D., Kasapovic, J., Pejic, S., Niciforovic, A., Pajovic, S.B. and Radojicic, M.B. (2005). Superoxide dismutase activity in various fractions of full bovine milk, *Acta Aliment.* 34 (3), pg. 219-226.

102. Fox, P. and Kelly, A. (2006). Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects Part 1, *International Dairy Journal* 16: pg. 500-516.
103. Fridovich, I. (1986). Superoxide dismutases. *Advances in Enzymology* 58, pg. 61-97.
104. Gaal, T., Speake, B.K., Mezes, M., Noble, R.C., Surai, P.F., Vajdovich, P. (1996). Antioxidant parameters and ageing in some animal species. *Comp Haematol Int*;6: pg. 208-213.
105. Gaal, T., Ribiczeyne-Szabo, P., Stadler, K., Jakus, J., Reiczigel, J., Kover, P., Mezes, M., Sumeghy, L. (2006). Free radicals, lipid peroxidation and the antioxidant system in the blood of cows and newborn calves around calving. *Comp Biochem Physiol B* 143, pg. 391-396.
106. Gao, R., Yuan, Z., Zhao, Z., Gao, X. (1998). Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 45, pg. 41-45.
107. Gebicki, S., Gill, K.H., Dean, R.T. and Gebicki, J.M. (2002). Action of peroxidases on protein hydroperoxides. *Redox Report*, 7, pg. 235-242.
108. Giannechini, R.E., Concha, C., Franklin, A. (2002). Antimicrobial susceptibility of udder pathogens isolated from dairy herds in the west littoral region of Uruguay. *Acta Vet Scand* 43: pg. 31-41.
109. Gilbert, R.O., Santos, N.R. Galv, K.N. Brittin, S.B. and Roman, H.B. (2007). The relationship between postpartum uterine bacterial infection (BI) and subclinical endometritis (SE). *J. Dairy Sci.* 90(Suppl. 1): 469. (Abstr.).
110. Goff, J.P. and Horst, R.L. (1997). Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *Journal of Dairy Science*, 80, pg. 1260-1268.
111. Goff, J.P. (2006). Major advances in our understanding of nutritional influences on bovine health. *J. Dairy Sci.* 89, pg. 1292-1301.
112. Gonzales, R.N., Cullor, J.S., Jasper, D.E., Farver, T.B., Bushnell, R.B., and Oliver, M.N. (1989). Prevention of clinical coliform mastitis in dairy cows by a mutant *Escherichia coli* vaccine. *J. Dairy Sci.* 53, pg. 301-305.
113. Green, M.J., Bradley, A.J., Medley, G.F., Browne, W.J. (2007). Cow, farm, and management factors that determine the rate of clinical mastitis after calving. *J. Dairy Sci.* 90, pg. 3764-3776.
114. Greiner, M., Gardner, I.A. (2000). Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. *Prev. Vet. Med.* 45 (2), pg. 3-22.
115. Gritz, B.G. and Rahko, T. (1990). Pathological findings in dietary produced oxidative stress in growing pigs. *Schweizer Arch Tierheilk* 132:435.
116. Grohn, Y.T., Rajala-Schultz, P.J., Allore, H.G., DeLorenzo, M.A., Hertl, J.A. and Galligan, D.T. (2003). Optimizing replacement of dairy cows modeling the effect of diseases. *Prev. Vet. Med.* 61, pg. 27-43.
117. Grummer, R.R. (1995). Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *J. Anim. Sci.* 73: pg. 2820-2833.
118. Gutteridge, J.M.C. and Halliwell, B. (1994). *Antioxidants in Nutrition, Health and Disease*. Oxford: Oxford University Press.
119. Hagnestam, C., Emanuelson, U., and Berglund, B. (2007). Yield losses associated with clinical mastitis occurring in different weeks of lactation. *Journal of Dairy Science* 90, pg. 2260-2270.
120. Halliwell, B. (1987). Oxidants and human disease: some new concepts. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, 1, pg. 358-366.
121. Halliwell, B. and Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *American Journal of Clinical Nutrition*, 57 (1993), pg. 715-725.

122. Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C. (1999). Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd ed. Oxford University Press, New York, NY.
123. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (2003). Free radicals in biology and medicine. Oxford: Oxford University Press.
124. Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141, pg. 312-322.
125. Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* 035, pg. 1147-1150.
126. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (2007). Free Radicals in Biology and Medicine, 4th ed. Oxford University Press.
127. Hamed, H., El Feki, A. and Ahmed, G. (2008). Total and differential bulk cow milk somatic cell counts and their relation with antioxidant factors. *C. R. Biologies Physiology/Physiologie* 331: pg. 144–151.
128. Hand, K.J., Godkin, A. and Kelton, D.F. (2012). Milk production and somatic cell counts: A cow-level analysis. *J. Dairy Sci.* 95: pg. 1358-1362.
129. Harmon, R.J., Lu, M., Trammel, D.S. and Smith, B.A. (1997). Influence of heat stress and calving on antioxidant activity in bovine blood. *J. Dairy Sci.* 80, Suppl. 1, (Abstr.): pg. 264.
130. Harouna, A., Zecchini, M., Locatelli, C., Scaccabarozzi, L., Cattaneo, C., Amadou, A., Bronzo, V., Marichatou, H., Boettcher, P.J., Zanoni, M.G., Alborali, L. and Moroni, P. (2009). Milk hygiene and udder health in the periurban area of Hamidallaye, Niger, *Tropical Animal Health and Production*, 41, pg. 705-710.
131. Hegde, R., Isloor, S., Nithin Prabhu, K., Shome, B.R., Rathnamma, D., Suryanarayana, V.V.S., Yatiraj, S., Renuka Prasad, C., Krishnaveni, N., Sundareshan, S., Akhila, D.S., Gomes, A.R. Hegde, N.R. (2013). Incidence of Subclinical Mastitis and Prevalence of Major Mastitis Pathogens in Organized Farms and Unorganized Sectors. *Indian J Microbiol*, 53(3): pg. 315-320.
132. Heleili, N., Ayachi, A., Melizi, M., Kassah, A.L., Mamache, B. (2012). Prevalence of subclinical bovine mastitis and the *in vitro* Sensitivity of Bacterial Isolates in Batna Governorate, East of Algeria. *J. Anim. Sci. Adv.* 2(6): pg. 576-582.
133. Hendriksen, R.S., Mevius, D.J., Schroeter, A., Teale, C., Meunier, D., Butaye, P., Franco, A., Utinane, A., Amado, A., Moreno, M., Greko, C., Stärk, K., Berghold, C., Myllyniemi, A., Wasyl, D., Sunde, M. and Aarestrup, F.M. (2008). Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens isolated from cattle in different European countries: 2002–2004. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 50: 28.
134. Hicks, C.L., Korycka-Dahl, M., Richardson, T. (1975). Superoxide dismutase in bovine milk. *J. Dairy Sci.* 58: 796.
135. Hillerton, J.E., Bramley, A.J., Staker, R.T., McKinnon, C.H. (1995). Patterns of intramammary infection and clinical mastitis over a 5 year period in a closely monitored herd applying mastitis control measures, *J. Dairy Res.* 62, 39-50.
136. Hillerton, J.E. and Berry, E.A. (2005). Treating mastitis in the cow - a tradition or an archaism. *Journal of Applied Microbiology* 98, pg. 1250-1255.
137. Hogan, J.S., Smith, K.L., Hoblet, K.H., Todhunter, D.A., Schoenberger, P.S., Hueston, W.D., Pritchard, D.E., Bowman, G.L., Heider, L.E., Brockett, B.L. (1989). Bacterial counts in bedding materials used on nine commercial dairies, *J. Dairy Sci.* 72, 250-258.
138. Hogan, J.S., Weiss, W.P., Todhunter, D.A., Smith, K.L., Schoenberger, P.S. (1992). Bovine neutrophil responses to parenteral vitamin E. *J. Dairy Sci.* 75, pg. 399-405.
139. Hogan, J. (2005). Human Health Risks Associated with High SCC Milk. In: *Proceedings of the British Mastitis Conference 2005*, Warwickshire, U.K.

140. Hogeveen, H., Kamphuis, C., Steeneveld, W. and Mollenhorst, H. (2010). Sensors and clinical mastitis. The quest for the perfect alert. *Sensors (Basel)* 10: pg. 7991–8009.
141. Hojo, Y. (1982). Selenium concentration and glutathione peroxidase activity in cow's milk. *Biological Trace Element Research*, 4, pg. 233-239.
142. Hojo, Y. (1986). Sequential study on glutathione peroxidase and selenium contents of human milk. *The Science of the Total Environment*, 52, pg. 83-91.
143. Holbrook, J. and Hicks, C.L. (1978). Variation of superoxide dismutase in bovine milk. *J. Dairy Sci.* 61: pg. 1072-1077.
144. Houben, H.E., Dijkhuizen, A.A., Van Arendonk, J.A., Huvine, R.B. (1993). Short and long term production losses and repeatability of clinical mastitis in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 76, pg. 2561-2578.
145. Huxley, J.N., Green, M.J., Green, L.E., Bradley, A.J. (2002). Evaluation of the efficacy of an internal teat sealer during the dry period. *J Dairy Sci*; 85: pg. 551-561.
146. Jakubowski, W., Bilinski, T. And Bartosz, G. (2000). Oxidative stress during aging of stationary cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radical Biology and medicine*, 28, pg. 659-664.
147. Jhambh, R., Dimri, U., Gupta, V.K. and Rathore, R. (2013). Blood antioxidant profile and lipid peroxides in dairy cows with clinical mastitis. *Vetworld*, pg. 271-273.
148. Jones, D.P., Eklow, L., Thor, H., Orrenius, S. (1981). Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes: relative contributions of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenously generated H₂O₂. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 210, pg. 505-516.
149. Jones, G.M. (2006). Understanding the basics of mastitis. Virginia Cooperative Extension, Publication No. 404-233. Virginia State Univ. Press, Virginia, USA, pg: 1-7.
150. Josephson, B. and Gyllensward, C. (1957). The development of the protein fractions and of cholesterol concentration in the serum of normal infants and children. *Scand J Clin Lab Invest.* 1957;9(1): pg. 29-38.
151. Kalmus, P., Auasme, B., Kurssin, A., Orro, T., Kask, K. (2011). Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia. *Acta Vet. Scand.*, 53, 4: pg. 1-7.
152. Kankofer, M. (2002). Placental release/retention in cows and its relation to peroxidative damage of macromolecules. *Reproduction in Domestic Animals*, 37, pg. 27-30.
153. Kankofer M., Albera E., Feldman M., Gundling N., Hoedemaker M. (2010a). Comparison of antioxidative/oxidative profiles in blood plasma of cows with and without retained fetal placental membranes. *Theriogenology*, 74, pg. 1385-1395.
154. Kankofer, M., Albera, E. and Rožanska-Boczula, M. (2010b) Activities of N-acetyl- β -d-glucosaminidase and glutathione peroxidase in bovine colostrums and milk *Czech J. Anim. Sci.*, 55, (11): pg. 488-495.
155. Karimuribo, E.D., Fitzpatrick, J.L., Bell, C.E., Swai, E.S., Kambarage, D.M., Ogden, N.H., Bryant M.J. and French, N.P. (2006). Clinical and sub clinical mastitis in smallholder dairy farms in Tanzania: Risk, intervention and knowledge transfer. *Preventive Veterinary Medicine*, 74: pg. 84-88.
156. Karyak, O.G., Safi, S., Froushani, A.R. and Bolourchi, M. (2011). Study of the relationship between oxidative stress and subclinical mastitis in dairy cattle. *Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University*, Vol. 12, No. 4, Ser. No. 37.
157. Kasapovic, J., Pejice, S, Mladenovice, M., Radlovice, N., Pajovice, S.B. (2005). Superoxide dismutase activity in colostrum, transitional and mature human milk. *Turkish J Pediatr* 47, pg. 343-347.

158. Kehrer, J.P. and Smith, C.V. (1994). Free radicals in biology: Sources, reactivities and roles in the etiology of human disease. In: *Natural Antioxidants in Health and Disease*, ed. B. Frei, Academic Press, London: pg. 25-62.
159. Khan, M.Z. and Khan, A. (2006). Basic facts of mastitis in dairy animals: A Review. *Pakistan Vet. J.*, 2006, 26(4): pg. 204-208.
160. Kivaria, F.M., Noordhuizen, J.P., Kapaga, A.M. (2004). Risk associated with Indicators subclinical mastitis in dairy cows in Tanzania Smallholder. *Trop. Anim. Health Prod.* 36: pg. 581-592.
161. Kivaria, F.M. and Noordhuizen, J.P.T.M. (2007). A retrospective study of the aetiology and temporal distribution of bovine clinical mastitis in smallholder dairy herds in the Dar es Salaam region of Tanzania. *Vet. J* 173, pg. 617-622.
162. Kizil, O., Ozdemir, H., Karahan, M., Kizil, M. (2007). Oxidative stress and alterations of antioxidant status in goats naturally infected with *Mycoplasma agalactia*. *Rev. Med. Vet.*, 158, pg. 326-330.
163. Kiyosawa, I., Matuyama, J., Nyui, S., Yoshida, K. (1993). Cu, Zn and Mn-superoxide dismutase concentration in human colostrums and mature milk. *Biosci Biotech Biochem* 57, pg. 676-677.
164. Kleczkowski, M., Kluciński, W., Shaktur, A., Sikora, J. (2005). Concentration of ascorbic acid in the blood of cows with subclinical mastitis. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 8, pg. 121-125.
165. Kleczkowski, M; Klucinski, W; Jakubowski, T; Fabisiak, M and Dembele, K (2008). Copper status and SOD activity in blood of cows affected with clinical mastitis. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 52: pg. 387-390.
166. Kloppert, B., Wolter, W., Risse, K. and Zschöck, M. (1999). Erregerspektrum bei boviner subklinischer Mastitis in hessischen Milcherzeugerbetrieben. In: *Tagungsbericht des 23. Kongresses der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.v. in Bad Nauheim.* pg. 350-355.
167. Kocak, O. (2006). Influence of Mastitis on Milk Yield in Holstein Cows. *Acta Vet. Brno*, 75, pg. 507-513.
168. Kohen, R. and Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.*, 30, pg. 620-650.
169. Kolb, E. and Seehawer, J. (2000). Effect of stress on cortisol secretion and vitamin metabolism in cattle. *Praktischer Tierarzt* , 81. pg. 1037-1046.
170. Komine, K., Kuroishi, T., Komine, Y., Watanabe, K., Kobayashi, J., Yamaguchi, T., Kamata, S.H., Kumagai, K. (2004). Induction of nitric oxide production mediated by tumor necrosis factor alpha on Staphylococcal enterotoxin C-stimulated bovine mammary gland cells. *Clin Diagn Laborat Immunol* 11: pg. 203-210.
171. Korycka-Dahl, M., Richardson, T., Hicks, C.L. (1979). Superoxide dismutase activity in bovine milk serum. *J Food Prot* 42, pg. 867-871.
172. Kozacinski, L.M., Iladziosmanovi, T., Majic, I., Jole, K., Cvrtila, Z. (2002). Relationships between the results of mastitis tests, somatic cell counts and the detection of mastitis agents in milk. *Praxis Vet.* 57: pg. 255-260.
173. Kovaceva, J., Platenik, J., Vejrazka, M., Stipek, S., Ardan, T., Cejka, C., Midelfart, A., Cejkova, J. (2007). Differences in activities of antioxidant superoxide dismutase, glutathione peroxidase and prooxidant xanthine oxidoreductase/xanthine oxidase in the normal corneal epithelium of various mammalia, *Physiol. Res.* 56, pg. 105-112.
174. L'Abbe, M.R. and Friel, J.K. (2000). Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxidase Content of Human Milk From Mothers of Premature and Full-Term

- Infants During the First 3 Months of Lactation. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 31: pg. 270-274.
175. Larsen, D. (2000). Milk quality and mastitis. *Vet. Microbiol.* 71, pg. 89-101.
176. LeBlanc, S.J., Herdt, T.H., Seymour, W.M., Duffield, T.F., Leslie, K.E. (2004). Peripartum serum vitamin E, retinol, and beta-carotene in dairy cattle and their associations with disease. *Journal of Dairy Science* 87, pg. 609-619.
177. LeBlanc, S.J. (2008). Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: a review. *The Veterinary Journal* 176, pg. 102-114.
178. Ledbetter, T.K., Paape, M.J. and Douglas, L.W. (2001). Cytotoxic effects of peroxynitrite, polymorphonuclear neutrophils, free radical scavengers, inhibitors of myeloperoxidase, and inhibitors of nitric oxide synthase on bovine mammary secretory epithelial cells. *Am. J. Vet. Res.* 62: pg. 286-293.
179. Levine, S.A., and Kidd, P.M. (1985). Antioxidant Adaptation. Its Role in Free Radical Pathology. Biocurrents Div., Allergy Research Group, San Leandro, Calif.
180. Lindmark-Mansson, H. and Akesson, B. (2000). Antioxidative factors in milk. *British Journal of Nutrition*, 84, pg. 103-110.
181. Lindmark-Mansson, H. and Akesson, B. (2001). Purification and immunochemical assay of bovine extracellular glutathione peroxidase. *International Dairy Journal*, 11, pg. 649-655.
182. Lindmark-Mansson, H., Chen, J., Paulsson, M., Alden, G., Ren, B., Ladenstein, R. and Akesson, B. (2001). The effect of storage and heat treatment on glutathione peroxidase in bovine milk and whey. *International Dairy Journal*, 11, pg. 71-81.
183. Lo, Y.Y.C., Wong, J.M.S., Cruz, T.F. (1996). Reactive oxygen species mediate cytokine activation of c-Jun NH₂- terminal kinases. *J Biol Chem*, 271: pg. 15703-15707.
184. Lykkesfeldt, J. and Svendsen, O. (2007) Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. *Vet. J.* 173, pg. 502-511.
185. Machado, V.S., Oikonomou, G., Lima, S.F, Bicalho, M.L.S., Kacar, C., Foditsch, C., Felipe, M.J., Gilbert, R.O., Bicalho, R.C. (2014). The effect of injectable trace minerals (selenium, copper, zinc, and manganese) on peripheral blood leukocyte activity and serum superoxide dismutase activity of lactating Holstein cows. *The Veterinary Journal* 200, pg. 299-304.
186. Maćešić, N., Karadjole1, T., Bačić, G., BeniĆ, M., Karadjole, M., Vince, S., Lipar, M. and Cergolj, M. (2012). Aetiology and prevalence of bovine intramammary infection at drying off. *Vet Arh.* 82 (2), pg. 125-131.
187. Mandelker, L. and Vajdovich, P. (2011). *Studies on Veterinary Medicine, Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice* 5, Springer Science+Business Media, LLC.
188. Marklund, S. and Marklund, G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47, pg. 469-474.
189. Mandevu, P., Ballard, C.S., Sniffen, C.J., Tsang, D.S., Valdez, F., Miyoshi, S., Schlatter, L. (2003). Effect of feeding an energy supplement prepartum and postpartum on milk yield and composition, and incidence of ketosis in dairy cows. *Anim. Feed Sci. Tech.* 105, pg. 81-93.
190. Matei, S.T., Groza, I., Bogdan, L., Ciupe, S., Fiş, N., Andrei, S. (2011). Correlation between mastitis pathogenic bacteria and glutathione peroxidase activity in cows milk. *Veterinary Medicine* 68(1), pg. 221-225.

191. Maurya, P.K., Aggarwal, A., Singh, S.V., Chandra, G., Singh, A.K. and Chaudhari, B.K. (2014). Effect of vitamin e and zinc on cellular antioxidant enzymes in karan fries cows during transition period. *Indian J. Anim. Res.*, 48 (2): pg. 109-119.
192. Mehrzad, J., Dosogne, H., Meyer, E., Heyneman, R. and Burvenich. C. (2001). Respiratory burst activity of blood and milk neutrophils in dairy cows during different stages of lactation. *J. Dairy Res.* 68: pg. 399-415.
193. Mehta, J.L. and Li, D. (2001). Epinephrine upregulates superoxide dismutase in human coronary artery endothelial cells. *Free Radic Biol Med*, 30: pg. 148-153.
194. Mekibib, B., Furgasa, M., Abunna, F., Megersa, B. and Regassa, A. (2010). Bovine Mastitis: Prevalence, Risk Factors and Major Pathogens in Dairy Farms of Holeta Town, Central Ethiopia. *Veterinary World Vol.* 3(9): pg. 397-403.
195. Mezes, M., Par, A., Bartosiewicz, G., Nemeth, J. (1987). Vitamin E content and lipid peroxidation of blood in some chronic inflammatory diseases. *Acta Physiol. Hung.* 69 (1), pg. 133-138.
196. Middleton, J.R., Hardin, D., Steevens, B., Randle, R., Tyler, J.W. (2004). Use of somatic cell counts and California mastitis test results from individual quarter milk samples to detect subclinical intramammary infection in dairy cattle from a herd with a high bulk tank somatic cell count. *Journal of American Veterinary Medical Association* 224, pg. 419-423.
197. Milesi, M.A. (2006). Oxidative, diseases and antioxidants. *Agro Food Ind Hi Tech*, 25(7): pg. 4-9.
198. Miller, R.H., Emanuelson, U., Brolund, L., Persson, E., Funke, H., Philipsson, J. (1984). Relationships of current bacteriological status of the mammary gland to daily milk yield and composition. *Acta Agric. Scand.* 34, pg. 133-144.
199. Miller, J.K., Brzezinska-Slebodzinska, E., Madsen, F.C. (1993). Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *J. Dairy Sci.* 76, pg. 2812-2823.
200. Mills, G.C. (1957). Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *Journal of Biological Chemistry*, 229, pg. 189-197.
201. Milne, M.H., Barrett, D.C., Fitzpatrick, J.L., Biggs, A.M. (2002). Prevalence and aetiology of clinical mastitis on dairy farms in Devon. *Vet. Rec.* 151, pg. 241-243.
202. Miltenburg, J.D., deLange, D., Crauwels, A.P.P., Bongers, J.H., Tielen, M.J.M., Schukken, Y.H., Elbers, A.R.W. (1996). Incidence of clinical mastitis in a random sample of dairy herds in the southern Netherlands. *Vet. Rec.* 139, pp. 204-207.
203. Mir, A.Q., Bansal, B.K. and Gupta, D.K. (2014). Subclinical mastitis in machine milked dairy farms in Punjab: prevalence, distribution of bacteria and current antibiogram. *Veterinary World*, EISSN: 2231-0916.
204. Morrisey, P.A. and O'Brien, N.M. (1998). Dietary antioxidants in health and disease. *Int Dairy J*;8: pg. 463-472.
205. Moyes, K.M., Larsen, T., Friggens, N.C., Drackley, J.K. and Ingvarsten, K.L. (2009). Identification of potential markers in blood for the development of subclinical and clinical mastitis in dairy cattle at parturition and during early lactation *J. Dairy Sci.* 92, pg. 5419-5428.
206. Mukherjee, R. (2008). Selenium and vitamin E increases polymorphonuclear cell phagocytosis and antioxidant levels during acute mastitis in riverine buffaloes. *Veterinary Research Communications* 32, pg. 305-313.
207. Mungube, E.O., Tenhagen, B.A., Regassa, F., Kyule, M.N., Shiferaw, Y., Kassa, T. et al. (2005). Reduced milk production in udder quarters with subclinical mastitis and associated economic loss in crossbred dairy cows in Ethiopia', *Tropical Animal Health and Production* 37, pg. 503-512.

208. Наков, Д. (2011). Анализа на ризик-факторите за појава на клинички мастит кај млечни крави во Република Македонија. Магистерски труд, Факултет за земјоделски науки и храна, Скопје.
209. Nakov, D., Trajcev, M. (2012). Udder quarter risk factors associated with prevalence of bovine clinical mastitis. *Mac Vet Rev*, Vol. 35(2): pg. 55-64.
210. Nakov, D., Trajcev, M., Andonov, S., Ostojic Andric, D. (2012). Relationship between milk yield of dairy cows and incidence of clinical mastitis during lactation. *Book of Proceedings of The 1st International Symposium on Animal Science, Book I, November 8th-10th 2012, Belgrade, Serbia*, pg. 778-789.
211. Nakov, D., Hristov, S., Andonov, S. Trajcev, M. (2014). Udder related risk factors for clinical mastitis in dairy cows. *Vet. arhiv*, 84(2), 111-127.
212. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). (2002). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, 2nd ed., approved standard M31-A2. NCCLS, Wayne, PA.
213. National Mastitis Council (NMC). (2001). National Mastitis Council Recommended Mastitis Control Program. [Http://www.nmconline.org/docs/NMC10steps.pdf](http://www.nmconline.org/docs/NMC10steps.pdf). 2001.
214. Naziroglu, M., A. Karaoglu, and A. O. Aksoy. (2004). Selenium and high dose vitamin E administration protects cisplatin-induced oxidative damage to renal, liver and lens tissues in rats. *Toxicology*, 195: pg. 221-230.
215. Ndiweni, N., Field, T.R., Williams, M.R., Booth, J.M., Finch, J.M. (1991). Studies on the incidence of clinical mastitis and blood levels of vitamin E and selenium in dairy herds in England. *Vet. Rec.*, 129: pg. 86-88.
216. Ndiweni, N., Finch, J.M. (1996). Effects of in vitro supplementation with atocopherol and selenium on bovine neutrophil function: implications for resistance to mastitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 51, pg. 67-78.
217. Nielsen, J.H., Hald, G., Kjeldsen, L., Andersen, H.J. and Ostdal, H. (2001). Oxidation of ascorbate in raw milk induced by enzymes and transition metals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, pg. 2998-3003.
218. Nielsen, C. (2009). Economic impact of mastitis on dairy cows. Doctoral thesis no 2009:29. Faculty of medicine and animal science, Swedish university of Agriculture
219. Nockels, C.F. (1991). Vitamin E requirement of beef cattle: influencing factors. BASF Technical Symposium. Minnesota Nutrition Conference, Holiday Inn, International Airport, September 16, Bloomington, MN, pg. 40-55.
220. Olde Riekerink, R.G.M., Barkema, H.W., Kelton, D.F. and Scholl, D.T. (2008). Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. *J. Dairy Sci.* 91: pg. 1366-1377.
221. Oliver, S.P., Gillespie, B.E., Headrick, S.J., Moorehead, H., Lunn, P., Dowlen, H.H., Johnson, D.L., Lamar, K.C., Chester, S.T., Moseley, W.M. (2004). Efficacy of extended ceftiofur intramammary therapy for treatment of subclinical mastitis in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87, pg. 2393-2400.
222. Ouweltjes, W., Beerda, B., Windig, J.J., Calus, M.P.L. and Veerkamp, R.F. (2007). Effects of management and genetics on udder health and milk composition in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90, pg. 229-238.
223. Oviedo-Boyso, J., Valdez-Alarcon, J.J., Cajero-Juarez, M., Ochoa-Zarzosa, A., Lopez-Meza, J.E., Bravo-Patino, A. and Baizabal-Aguirre. V.M. (2007). Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J. Infect.* 54: pg. 399-409.

224. Owens, W.E., Nickerson, S.C., Washburn, P.J., Roy, C.H. (1991). Efficacy of a cephalosporin dry cow product for treatment of experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis in heifers. *J. Dairy Sci.* 74, pg. 3376-3382.
225. Owens, W.E., Nickerson, S.C., Boddie, R.L., Tomita, G.M., Ray, C.H. (2001). Prevalence of mastitis in dairy heifers and effectiveness of antibiotic therapy. *J. Dairy Sci.* 84, pg. 814-817.
226. Paglia, D.E. and Valentine, W.N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70, pg. 158-169.
227. Pandey, N.N., Dar, A.A., Mondal, D.B. and Nagaraja, L. (2011). Bovine colostrum: A veterinary nutraceutical. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health* Vol. 3(3), pg. 31-35.
228. Pankey, J.W., Drechsler, P.A., and Wildman, E.E. (1991). Mastitis prevalence in primigravid heifers at parturition. *J. Dairy Sci.* 74, pg. 1550-1556.
229. Paradis, M.È., Haine, D., Gillespie, B., Oliver, S.P., Messier, S., Comeau, J., Scholl, D.T. (2012). Bayesian estimation of the diagnostic accuracy of a multiplex real-time PCR assay and bacteriological culture for 4 common bovine intramammary pathogens. *J. Dairy Sci.* 95 : pg. 6436-6448.
230. Parantainen, J., Tenhunen, E., Kangasniemi, R., Sankari, S. and Atroshi, F. (1987). Milk and blood levels of silicon and selenium status in bovine mastitis. *Vet. Res. Commun.*, 115: pg. 467-477.
231. Patel S.P., and Katyare S.S. (2006). Differential pH sensitivity of tissue superoxide dismutases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 2006 / 21 (2) pg. 129-133.
232. Pavlak, M., Benić, M., Cvitković, D., Tadić, M. (2008). Epidemiological data of intramammary infection in cattle - a quantitative analysis of published data. *Proceedings of the XVI. Congress of the Mediterranean Federation for Health and Production of Ruminants*, 22-26 April, Zadar, Croatia. pg. 97-112.
233. Pedernera, M., Celi, P., García, S.C., Salvin, H.E., Barchia, I., Fulkerson, W.J. (2010). Effect of diet, energy balance and milk production on oxidative stress in early-lactating dairy cows grazing pasture. *The Veterinary Journal* 186, pg. 352-357.
234. Peeler, E.J., Green, M.J., Fitzpatrick, J.L., Morgan, K.L., Green, L.E. (2000). Risk Factors Associated with Clinical Mastitis in Low Somatic Cell Count British Dairy Herds. *J. Dairy Sci.* 83, pg. 2464-2472.
235. Persson, Y., Nyman, A.J. and Grönlund-Andersson, U. (2011). Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden *Acta Veterinaria Scandinavica*, 53:36.
236. Petrovski, K. and Stefanov, E. (2006). Milk composition changes during mastitis, www.milkproduction.com/library/articles.
237. Piessens, V., De Vliegher, S., Verbist, B., Braem, G., Van Nuffel, A., De Vuyst, L., Heyndrickx, M., Van Coillie, E. (2012). Intra-species diversity and epidemiology varies among coagulase-negative *Staphylococcus* species causing bovine intramammary infections. *Vet Microbiol* 155: pg. 62-71.
238. Polack, E.W., King, J.M., Cummings, J.F., Mohammed, H.O., Birch, M., Cronin, T. (2000). Concentrations of trace minerals in the spinal cord of horses with equine motor neuron disease. *Am J Vet Res*; 61: pg. 609-611.
239. Poutrel, B. and Rainard, P. (1981). California Mastitis test guide of selective dry cow therapy. *J. Dairy Sci.* 64, pg. 241-248.
240. Powell, D.W. (1991). Immune physiology of intestinal electrolyte transport. In: *Handbook of Physiology 6. The Gastrointestinal System IV. Intestinal absorption and secretion*. American Physiology Society, Bethesda, MD, pg. 591.

241. Przybylska, J., Albera, E. and Kankofer, M. (2007). Antioxidants in Bovine Colostrum *Reprod Dom Anim* 42, pg. 402-409.
242. Pyorala, S. (2003). Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Vet Res* 34: pg. 564-578.
243. Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B. and Carter, G.R. (1999). *Clinical Veterinary Microbiology*, Mosby: London, UK. pg. 21–66.
244. Radostits, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W., Constable, P.D. (2007). *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. Saunders W. B., 10th ed., Elsevier Limited, Chapter 15, pg. 673-749.
245. Rahman, M.A., Bhuiyan, M.M.U., Kamal, M.M., and Shamsuddin, M. (2009). Prevalence and risk factors of mastitis in dairy cows *The Bangladesh Veterinarian*, 26(2), pg. 54-60.
246. Rainard, P. and Riollet, C. (2006). Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet. Res.* 37, pg. 359-368.
247. Rajala-Schultz, P.J., Grohan, J.T., McCulloch, C.E., and Guard, C.L. (1999). Effects of Clinical Mastitis on Milk Yield in Dairy Cows. *J Dairy Sci* 82, pg. 1213–1220.
248. Ramirez, N.F., Keefe, G., Dohoo, I., Sanchez, J., Arroyave, O., Ceron, J., Jaramillo, M., Palacio, L.G. (2014). Herd and cow-level risk factors associated with subclinical mastitis in dairy farms from the high plans of the northern Antioquia, Colombia. *J. Dairy Sci.* 97: pg. 4141-4150.
249. Ranjan, R., Swarup, D., Naresh, R. and Patra, R.C. (2005). Enhanced erythrocytic lipid peroxides and reduced plasma ascorbic acid, and alteration in blood trace elements level in dairy cows with mastitis. *Vet. Res. Commun.* 29: pg. 27-34.
250. Ranjan, R., Gupta, M.K., Singh, S., Kumar, S. (2010). Current trend of drug sensitivity in bovine mastitis. *Vet. World* 3(1): pg. 17-20.
251. Rasmussen, M.D., Bjerring, M., Skjoth, F. (2005). Visual appearance and CMT score of foremilk of Individual quarters in relation to cell count automatically milked. *J. Dairy Res.* 72: pg. 49-56.
252. Ribeiro, M.T. (1991). Caracterização de Staphylococcus isolados de quartos mamários de bovinos inicialmente reagentes a prova do “California Mastitis Test”. Rio de Janeiro, M.S. Thesis. Instituto de Veterinária, UFRRJ.
253. Rodriguez, Z., Gianola, S.L.D. and Shook, G.E. (2000). Evaluation of models for somatic cell score lactation patterns in Holsteins. *Livestock Prod. Sci.*, 67: pg. 19-30.
254. Rodriguez, G. (2006). Comportamiento de la mastitis bovina y su impacto economico en algunos hatos de la Sabana de Bogota, Colombia. *Rev. Med. Vet.* 12: pg. 35-55.
255. Roesch, M., Doherr, M.G., Schären, W., Schällibaum, M., Blum, J.V. (2007). Subclinical mastitis in dairy cows in Swiss organic and conventional production systems. *J Dairy Res*, 74: pg. 86-92.
256. Roy, J.P., Tremblay, D.D., Coteaux, L.D., Messier, S., Scholl, D., Bouchard, E. (2009). Evaluation of the California Mastitis Test as a precalving treatment selection tool for Holstein heifers. *Veterinary Microbiology* 134, pg. 136-142.
257. Ronchi, B., Bernabucci, U., Lacetera, N., Nardone, A. (2000). Oxidative and metabolic status of high yielding dairy cows in different nutritional conditions during the transition period. *Proc. 51st Annu. Mtg. E.A.A.P.I, Vienna*, 125.
258. Rossitto, P.V., Ruiz, L., Kikuchi, Y., et al. (2002). Antibiotic susceptibility patterns for environmental streptococci isolated from bovine mastitis in central California dairies. *J Dairy Sci* 85: pg. 132-138.
259. Sagisawa, H., Itou, T., Ichimura, Y. and Sakai, T. (2002). Bovine milk enhances the oxidative burst activity of polymorphonuclear leukocytes in low concentrations. *Journal of veterinary medicine science*, 64, pg. 1113-1116.

260. Saidi, R., Khelef, D., Kaidi, R. (2013). Bovine mastitis: Prevalence of bacterial pathogens and evaluation of early screening test *Afr. J. Microbiol. Res.* Vol. 7(9), pg. 777-782.
261. Saini, V., McClure, J.T., Scholl, D.T. DeVries, T.J. and Barkema, H.W. (2013). Herd-level relationship between antimicrobial use and presence or absence of antimicrobial resistance in gram-negative bovine mastitis pathogens on Canadian dairy farms. *Dairy Sci.* 96 : pg. 1-12.
262. Salganik, R.I. (2001). The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. *Journal of the American College of Nutrition* 20, pg. 464-472.
263. Sanford, C.J., Keefe, G.P., Sanchez, J., Dingwell, R.T., Barkema, H.W., Leslie, K.E., Dohoo, I.R., 2006. Test characteristics from latent-class models of the California Mastitis Test. *Prev. Vet. Med.* 77, pg. 96-108.
264. Sargeant, J.M., Leslie, K.E., Shirley, J.E., Pulkrabek, B.J. and Lim, G.H. (2001). Sensitivity and specificity of somatic cell count and California mastitis test for identifying intramammary infection in early lactation. *J. Dairy Sci.* 84, pg. 2018-2024.
265. Sarker, C., Parvin, M.S., Rahman, A.K.M.A. and Islam, M.T. (2013). Prevalence and risk factors of subclinical mastitis in lactating dairy cows in north and south regions of Bangladesh *Swapan Trop Anim Health Prod* 45: pg. 1171-1176.
266. Schalm, O., Noorlander, D., 1957. Experiments and observations leading to the development of California mastitis test. *Journal of American Veterinary Medical Association* 130, pg. 199-204.
267. Schalm, O.W., Carrlolle, E.J., Jain, N.C. (1971). *Bovine Mastitis*. Philadelphia: Lea and Teliger. pg. 1-21.
268. Schneider, M.P., Strandberg, E., Emanuelson, U., Grandinson, K. and Roth, A. (2007). The effect of veterinary-treated clinical mastitis and pregnancy status on culling in Swedish dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine* 80, pg. 179-192.
269. Schukken, Y.H., Grommers, F.J. van de Geer, D., and Brand, A. (1989). Incidence of clinical mastitis on farms with low somatic cell counts in bulk milk. *Vet. Rec.* 125: 60.
270. Schukken, Y.H., Wilson, D.J., Welcome, F., Garrison-Tinofsky, L., Gonzales, R.N. (2003). Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Vet Res* 34: pg. 579-596.
271. Schukken, Y.H., Tikofsky, L.L., Zadoks, R.N. (2005). Environmental control for mastitis prevention, milk quality and safety. In: Hogeveen, H. (Ed.), *Mastitis in Dairy Production: Current Knowledge and Future Solutions*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen.
272. Schukken, Y.H., Bennett, G.J., Zurakowski, M.J., Sharkey, H.L., Rauch, B.J., Thomas, M.J., Ceglowski, B., Saltman, R.L., Belomestnykh, N. and Zadoks, R.N. (2011). Randomized clinical trial to evaluate the efficacy of a 5-day ceftiofur hydrochloride intramammary treatment on nonsevere gram-negative clinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 94: pg. 6203-6215.
273. Sears, P.M., Smith, B.S., English, P.B. (1990). Shedding patterns of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infections. *J. Dairy Sci.* 73, pg. 2785-2789.
274. Seegers, H., Fourichon, C., and Beaudeau, F. (2003). Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet. Res.* 34, pg. 475-491.
275. Sharma, N., Gupta, S.K., Soodan, J.S. and Upadhyay, S.R. (2005). Role of vitamin E and selenium in bovine mastitis: As antioxidant. *Proceeding of National symposium and workshop on mineral imbalances in livestock and their impact on animal health*

- and production in Jammu and Kashmir state held at F.V.Sc. and A.H. (SKUAST-J), R.S. Pura, Jammu on 8-9th Dec. 2005, pg. 139-148.
276. Sharma, N., Gautam, A., Upadhyay, S.R., Hussain, K., Soodan, J.S. and Gupta, S.K. (2006). Role of antioksidants in udder health. A rev. Ind. J. Field Veterinarian, 2: pg. 73-76.
277. Sharma, N., Singh, N.K., Bhadwal, M.S. (2011). Relationship of somatic cell count and mastitis: an overview. Asian-Australas J Anim Sci 24: pg. 429-438.
278. Sharma, N., Rho, G.J., Hong, Y.H., Kang, T.Y., Lee, H.K., et al. (2012). Bovine mastitis: an asian perspective. Asn J Anim Vet Adv 7: 454-476.
279. Shoji, H., Oguchi, S., Shimizu, T., Yamashiro, Y. (2003). Effect of human breast milk on urinary 8-hydroxy-2 ϵ deoxyguanosine excretion in infants. Pediatric Res 53, pg. 850-852.
280. Shpigel, N.Y., Winkler, M., Ziv, G., Saran, A. (1998). Clinical, bacteriological and epidemiological aspects of clinical mastitis in Israeli dairy herds Prev. Vet. Med. 35, pg. 1-9.
281. Siciliano-Jones, J.L., Socha, M.T., Tomlinson, D.J., DeFrain, J.M. (2008). Effect of trace mineral source on lactation performance, claw integrity, and fertility of dairy cattle. J. Dairy Sci. 91, pg. 1985-1995.
282. Сл. весник на РМ (96/2011). Правилник за барања за квалитетот на суровото млеко, стандардите за квалитет на конзумното млеко, млечните производи и употребата на нивните називи, квалитетот и активноста на starter културите, сирилата и други специфични материи и начинот на нивна употреба, начинот на дополнително означување на млекото и млечните производи како и дозволеното отстапување на тежината во однос на декларираната.
283. Сл. весник на РМ (26/2012). Правилник за посебните барања за безбедност и хигиена и начинот и постапките за вршење на службените контроли на млекото и млечните производи.
284. Smith, K.L., Todhunter, D.A., Schoenberger, P.S., 1985. Environmental pathogens and intramammary infection during the dry period. J. Dairy Sci. 68, pg. 402-417.
285. Sordillo, L.M. (2005). Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. Livestock Prod. Sci. 98, pg. 89-99.
286. Sordillo, L.M., O'Boyle, N., Gandy, J.C., Corl, C.M., Hamilton, E. (2007). Shifts in thioredoxin reductase activity and oxidant status in mononuclear cells obtained from transition dairy cattle. J. Dairy Sci. 90, pg. 1186-1192.
287. Sordillo, L.M. and Aitken. S.L. (2009). Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. Vet. Immunol. Immunopathol. 128: pg. 104-109.
288. Sordillo, L.M. (2013). Selenium-dependent regulation of oxidative stress and immunity in periparturient dairy cattle. Vet. Med, 15: pg. 40-45.
289. Spears, J.W. and Weiss, W.P. (2008). Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. Vet. J. 176: pg. 70-76.
290. Stagsted, J. (2006). Absence of both glutathione peroxidase activity and glutathione in bovine milk International Dairy Journal 16, pg. 662-668.
291. Steeneveld, W., Hogeveen, H., Barkema, H.W., van den Broek, J. and Huirne, R.B.M. (2008). The Influence of Cow Factors on the Incidence of Clinical Mastitis in Dairy Cows. Journal of Dairy Science 91(4), pg. 1391-1402.
292. Stefanon, B., Sgorlon, S., Gabai, G. (2005). Usefulness of nutraceuticals in controlling oxidative stress in dairy cows around parturition. Vet. Res. Commun. 29 (Suppl. 2), pg. 387-390.

293. Suriyasathaporn W., Schukken, Y.H., Nielen, M., Brand, A. (2000). Low somatic cell count: a risk factor for subsequent clinical mastitis in a dairy herd. *J.Dairy Sci.* 83, pg. 1248.
294. Suriyasathaporn, W., Vinitketkumnuen, U., Chewonarin, T., Chupia, V. and Pinyopummintr, T. (2009). The Indicative Influence of Oxidative Stress on Low Milk Yields in Dairy Cattle. *Thai J Vet Med* 39, pg. 237-243.
295. Sviland, S. and Waage, S. (2002). Clinical bovine mastitis in Norway *Prev. Vet. Med.* 54, pg. 65-78.
296. Swarup, D. (2001). Potential uses of antioxidants in management of diseases of large ruminants. In: *Proc. XIX Annl. Con. Indian Soc. Vet. Med. On current trends on diagnostic, therapeutic approach and development of vaccines against diseases of livestock and poultry.* April 9-11. pg. 5-9.
297. Swinehart, D.F. (1962). The Beer-Lambert law. *J. Chem. Educ.* 39,7: 333.
298. Tanaka, M., Kamiya, Y., Suzuki, T., Nakai, Y. (2011). Changes in oxidative status in periparturient dairy cows in hot conditions *Animal Science Journal* Volume 82, Issue 2, pg. 320-324.
299. Taponen, S. and Pyorala, S. (2009). Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis—Not so different from *Staphylococcus aureus*? *Veterinary Microbiology* 134, pg. 29-36.
300. Taponen, S., Salmikivi, L., Simojoki, H., Koskinen, M.T. and Pyorala, S. (2009). Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. *J. Dairy Sci.* 92: pg. 2610-2617.
301. Todhunter, D.A., Smith, K.L., Hogan, J.S., and Schoenberger, P.S. (1991). Gram-negative bacterial infections of the mammary gland in cows. *Am. J. Vet. Res.* 52: 184.
302. Трајчев, М., Маширов, Ж., Христовски, М., Трајковски, Т. (1997). Хигиена на млечната жлезда кај крави во сувостоен период. *Македон. земјод. рев.*, 44 (1-2), стр. 55-60.
303. Трајчев, М., Наков, Д. 2009. Програма за контрола на маститисите во стадо со молзни крави. Годишен зборник на Факултетот за земјоделски науки и храна, вол. 54, Скопје, стр. 123-140.
304. Трајчев, М., Поповски, З.Т., Наков, Д., Димитриевска, Б.П., Порчу, К., Петровска, М., Јанкоска, Г. (2009). Карактеризација на резистентноста кај изолати на *Streptococcus Spp.* и *Staphylococcus Spp.* изолирани во млеко од крави во лактација. 4-ти Конгрес на микробиолозите на Македонија со меѓународно учество - Зборник на апстракти, *Мак. мед. преглед*, год 63, (супл 77), стр. 1-87.
305. Трајчев, М., Петровска, М., Наков, Д., Јанкоска, Г. (2010). Терапија на субклиничкиот маститис кај молзни крави. Годишен зборник на Факултетот за земјоделски науки и храна, вол. 55, Скопје, стр. 117-128.
306. Трајчев, М., и Наков, Д. (2010). Дистрибуција на нарушена секреција и на субклиничкиот маститис помеѓу четвртинките од млечната жлезда кај молзни крави. Годишен зборник на Факултетот за земјоделски науки и храна, вол. 55, Скопје, стр. 129-138.
307. Trajcev, M., Nakov, D., Hristov, S., Andonov, S., Joksimovic-Todorovic, M. (2013). Clinical bovine mastitis in Macedonia dairy herds. *J. Acta Vet. Belgrade*, Vol. 63, 1, pg. 63-76.
308. Trinidad, P., Nickerson, S.C., and Alley, T.K. (1990). Prevalence of intra-mammary infection and teat canal colonization in unbred and primigravid dairy heifers. *J. Dairy sci.* 73, pg. 107-114.

309. Turk, R., Juretic, D., Geres, D., Turk, N., Rekec, B., Simeon-Rudolf, V., Svetina, A. (2004). Serum paraoxonase activity and lipid parameters in the early postpartum period of dairy cows, *Research in Veterinary Science*, 76, pg. 57-61.
310. Turk, R., Podpečan, O., Mrkun, J., Kosec, M., Flegar-Meštrić, Z., Perkov, S., Starič, J., Robić, M., Belić, M. and Zrimšek, P. (2013). Lipid mobilisation and oxidative stress as metabolic adaptation processes in dairy heifers during transition period. *Anim Reprod Sci* 141, pg. 109-115.
311. Tuzun, A., Erdil, A., Inal, V., Aydm, A., Bagci, S., Yesilova, Z., Sayal, A., Karaeren, N. and Dagalp, K. (2002). Oxidative stress and antioxidant capacity in patient with inflammatory bowel disease. *Clin. Biochem.* 35: pg. 569-572.
312. Urban, C.F., Lourido, S., Zychlinsky, A. (2006). How do microbes evade neutrophil killing? *Cell Microbiol*, 8: pg. 1687-1696.
313. Valde, J.P., Lawson, L.G., Lindberg, A., Agger, J.F., Saloniemi, H., Osteras, O. (2004). Cumulative risk of bovine mastitis treatments in Denmark, Finland, Norway and Sweden. *Acta vet. scand.* 45, pg. 201-210.
314. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39: pg. 44-84.
315. Vazquez, A. I., Gianola, D., Bates, D., Weigel, K.A., and Heringstad, B. (2009). Assessment of Poisson, logit, and linear models for genetic analysis of clinical mastitis in Norwegian Red cows. *J. Dairy Sci.* 92, pg. 739-748.
316. Vieira-da-Motta, O., Folly, M.M., Sakyiama, C.C.H. (2001). Detection of different *Staphylococcus aureus* strains in bovine milk from subclinical mastitis using pcr and routine technique. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32: pg. 27-31.
317. Viguier, C., Arora, S., Gilmartin, N., Welbeck, K., O'Kennedy, R. (2009). Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends Biotechnol*;27: pg. 486-493.
318. Violi, F., Iuliano, L., Alessandri, C., Ghiselli, A. and Balsano, F. (1985). Simple method for evaluating platelet superoxide dismutase. *Scand J Clin Lab Invest* 1985; 45: pg. 713-716.
319. Waage, S., Mork, T., Roros, A., Aasland, D., Hunshamar, A., and Odegaard, S.A. (1999). Bacteria associated with clinical mastitis in dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 82, pg. 712-719.
320. Wachter, C.M., McDaniel, B.T, Whitlow, L.W. and Pettyjohn, S. (1999). Genetics of antioxidant activity in Holsteins and Jerseys: associations with various traits. *Journal of Dairy Science* 82 (Suppl. 1), 31.
321. Wagner, D.D.M., Burton, G.W., Ingold, K.U, Barclay, L.R.C. and Lake, S.J. (1987). The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochem. Biophys. Acta* 924:408.
322. Wallace, J.A., Leslie, K.E., Dingwell, R.T., Schukken, Y.H., Baillargeon, P. (2002). An evaluation of a diagnostic and treatment protocol for intramammary infections in early postpartum dairy cows. *Proc Annu Meet National Mastitis Council*: pg. 159-160.
323. Wang, Y.M., Wang, J.H., Wang, C., Wang, J.K., Chen, B., Liu, J.X., Cao, H. and Guo, F.C. (2010). Effect of dietary antioxidant and energy density on performance and anti-oxidative status of transition cows asian-Aust. *J. Anim. Sci.* Vol. 23, No. 10: pg. 1299-1307.
324. Weiss, W.P., Hogan, J.S., Smith, K.L. (2004). Changes in vitamin C concentrations in plasma and milk from dairy cows after an intramammary infusion of *Escherichia coli*. *J. Dairy Sci.* 87, pg. 32-37.

325. White, L.J., Lam, T.J., Schukken, Y.H., Green, L.E., Medley, G.F., Chappell, M.J. (2006). The transmission and control of mastitis in dairy cows: a theoretical approach. *Prev. Vet. Med.* 74, pg. 67-83.
326. Wichtel, J.J. (1998). A review of selenium deficiency in grazing ruminants. Part 1: new roles for selenium in ruminant metabolism. *N. Z. Vet. J.* 46, pg. 47-52.
327. Wilde, D. (2006). Influence of macro and micro minerals in the periparturient period on fertility in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 96, pg. 240-249.
328. Wilson, D.J., Gonzalez, R.N. and Das. H.H. (1997). Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: Prevalence and effects on somatic cell count and milk production. *J. Dairy Sci.* 80: pg. 2592–2598.
329. Wolf, J. Wolfova, M., and Štipkova, M. (2009). A model for the genetic evaluation of number of clinical mastitis cases per lactation in Czech Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 93, pp.1193–1204.
330. Wullepit, N., Raes, K., Beerda, B., Veerkamp, R.F., Fremaut, D. and De Smet, S. (2009). Influence of management and genetic merit for milk yield on the oxidative status of plasma in heifers. *Livestock Science* 123: pg. 276-282.
331. Workineh, S., Bayleyegne, M., Mekonnen H., and Potgieter L. N. D. (2002). Prevalence and aetiology of mastitis in cow from two major Ethiopian dairies. *Trop. Anim. Hlth Production.* 34, pg. 19-25.
332. Wu, X.L., Heringstad, B., and Gianola, D. (2008). Exploration of lagged relationships between mastitis and milk yield in dairy cows using a Bayesian structural equation Gaussian-threshold model. *Genet. Sel. Evol.* 40, pg. 333–357.
333. Yang, F.L., Li, X.S., He, B.X., Yang, X.L., Li, G.H., Liu, P., Huang, Q.H., Pan, X.M., and Li, L. (2011). Malondialdehyde level and some enzymatic activities in subclinical mastitis milk African Journal of Biotechnology Vol. 10(28), pg. 5534-5538.
334. Zadoks, R.N., Gillespie, B.E., Barkema, H.W., Sampimon, O.C., Oliver, S.P., Schukken, Y.H. (2003). Clinical, epidemiological and molecular characteristics of *Streptococcus uberis* infections in dairy herds. *Epidemiol. Infect.* 130, pg. 335-349.
335. Zadoks, R.N., Middleton, J.R., McDougall, S., Katholm, J., Schukken, Y.H. (2011). Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 16:357-372.
336. Zeryehun, T., Aya, T. and Bayecha, R. (2013). Study on prevalence, bacterial pathogens and associated risk factors of bovine mastitis in small holder dairy farms in and around Addis Ababa, Ethiopia. *J. Anim. Pla. Sci.* 23(1): pg. 50-55.
337. Zhao, X. and Lacasse, P. (2008). Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *J. Anim. Sci.* 86: pg. 57-65.