

Higijenska kvaliteta sirovog mlijeka paške ovce

Reponj, Barbara

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:800315>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



HIGIJENSKA KVALITETA SIROVOG MLIJEKA PAŠKE OVCE

DIPLOMSKI RAD

Barbara Reponj

Zagreb, rujan, 2021.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Diplomski studij:

Proizvodnja i prerada mlijeka

HIGIJENSKA KVALITETA SIROVOG MLIJEKA PAŠKE OVCE

DIPLOMSKI RAD

Barbara Reponj

Mentor:

izv. prof. dr. sc. Antun Kostelić

Zagreb, rujan, 2021.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZJAVA STUDENTA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, Barbara Reponj, JMBAG 0178110253, rođena 19.02.1996. u Požegi, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

HIGIJENSKA KVALITETA SIROVOG MLIJEKA PAŠKE OVCE

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studentice



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Barbare Reponj**, JMBAG 0178110253, naslova

HIGIJENSKA KVALITETA SIROVOG MLIJEKA PAŠKE OVCE

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

- | | | | |
|----|--------------------------------|--------|-------|
| 1. | izv.prof.dr.sc. Antun Kostelić | mentor | _____ |
| 2. | doc.dr.sc. Nataša Mikulec | član | _____ |
| 3. | doc.dr.sc. Miroslav Benić | član | _____ |

Zahvala

Ovim putem zahvaljujem se svom mentoru izv. prof. dr. sc. Antunu Kosteliću koji je puno pomogao u realizaciji ovog rada, te svojim savjetima pomogao pri pisanju. Zahvaljujem mu što mi je kao izvrsni stručnjak i predavač prenio puno teoretskog, ali i praktičnog znanja. A posebno mu zahvaljujem što je vjerovao da ću ove godine diplomirati.

Zahvaljujem doc. dr. sc. Miroslavu Beniću koji je omogućio provođenje analiza tijekom istraživanja.

Zahvaljujem se svojim roditeljima, sestrama i bratu koji su u svakom trenutku mog školovanja pa tako i tijekom fakulteta uvijek bili uz mene i podupirali me u mojim odlukama. Bez njihove moralne, emocionalne i financijske pomoći ne bih došla ovako daleko i bila tu gdje jesam.

Zahvaljujem se svim svojim prijateljima, posebno onima koji su tu bili od prve godine fakulteta, ali i onima koji su došli kasnije. Uz njih su svaki odlazak na fakultet i svaka zapreka i zadatak bili manje naporni i stresni.

Također zahvaljujem svim profesorima i djelatnicima Agronomskog fakulteta u Zagrebu koji su studiranje na ovom fakultetu učinili nezaboravnim iskustvom.

Sadržaj

Sažetak.....	1
Summary.....	2
1. UVOD.....	3
2. SOMATSKE STANICE U OVČJEM MLIJEKU	5
2.1. Utjecaj različitih faktora na broj somatskih stanica.....	5
2.2. Tipovi somatskih stanica	8
3. UPALA MLIJEČNE ŽLIJEZDE (lat. <i>mastitis</i>).....	9
3.1. Subklinička upala mliječne žlijezde	11
3.1.1. Čimbenici koji utječu na pojavu subkliničke upale mliječne žlijezde	12
3.2. Klinička upala mliječne žlijezde	13
3.3. Oblici upale mliječne žlijezde	14
3.3.1. Akutna žljezdana upala	14
3.3.2. Kataralna upala	16
3.4. Akutna i kronična upala mliječne žlijezde	17
3.5. Sastav i preradbene odlike mlijeka životinja oboljelih od upale mliječne žlijezde	18
4. MIKROORGANIZMI U OVČJEM MLIJEKU	19
4.1. <i>Staphylococcus spp.</i>	20
4.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	21
4.1.2. Koagulaza-negativni stafilokoki.....	22
4.2. <i>Streptococcus spp.</i>	23
4.3. <i>Escherichia coli</i>	24
5. MATERIJALI I METODE	25
5.1. Mikrobiološka pretraga	25
5.2. Identifikacija streptokoka	25
5.3. Identifikacija stafilokoka.....	26
5.4. Identifikacija Gram – negativnih bakterija	27
5.5. Određivanje broja somatskih stanica.....	27
5.6. Statistička obrada podataka	27
6. REZULTATI I RASPRAVA	28
7. ZAKLJUČAK	33
8. LITERATURA.....	34
ŽIVOTOPIS	38

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Barbare Reponj**, naslova

HIGIJENSKA KVALITETA SIROVOG MLIJEKA PAŠKE OVCE

Paška ovca se uzgaja ekstenzivno na krškim pašnjacima, a mužnja se odvija uglavnom ručna u kante u toru ili na samim pašnjacima. Zbog ovakvog načina uzgoja i mužnje u mlijeko dopijeva određena količina prljavštine, odnosno dlake, slama te izmet životinja koji uvelike narušavaju kvalitetu mlijeka te u mlijeko mogu dospjeti patogeni mikroorganizmi. Zbog toga je cilj istraživanja bio utvrditi broj mikroorganizama i somatskih stanica u sirovom mlijeku paške ovce te utvrditi koje su to bakterije u mlijeku najčešći uzročnici mastitisa u ovaca. Istraživanje je provedeno u 10 stada ovaca, od veljače do svibnja. Analize su provedene u Hrvatskom veterinarskom institutu u Zagrebu. Istraživanjem je utvrđeno da je 50% uzoraka imalo broj somatskih stanica manji od 500 000/mL, a broj mikroorganizama je u 68% uzoraka bio iznad 1 000 000cfu/mL (eng. cfu=colony-forming unit). U mlijeku su također detektirani *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.* te *E.coli*. Rezultati nisu upućivali na postojanje upale već na naknadnu kontaminaciju mlijeka mikroorganizmima. Potrebno je poboljšati higijenu mužnje kako bi se dobilo mlijeko visoke kvalitete.

Ključne riječi: higijenska kvaliteta, somatske stanice, mikroorganizmi, mastitis, paška ovca

Summary

Of the master's thesis – student **Barbara Reponj**, entitled

HYGIENIC QUALITY OF RAW MILK OF PAG SHEEP

Pag sheep are reared extensively on karst pastures, and milking takes place mainly by hand in buckets in the corral or on the pastures themselves. Due to this method of breeding and milking, a certain amount of dirt, i.e. hair, straw and animal feces, gets into the milk, which greatly impairs the quality of the milk, and pathogenic microorganisms can get into the milk. Therefore, the aim of the study was to determine the number of microorganisms and somatic cells in the raw milk of Pag sheep and to determine which bacteria in milk are the most common causes of mastitis in sheep. The study was conducted in 10 flocks of sheep, from February to May. The analyzes were performed at the Croatian Veterinary Institute in Zagreb. The study found that 50% of the samples had a somatic cell count of less than 500,000 / mL, and the number of microorganisms in 68% of the samples was above 1,000,000 cfu / mL. *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.* and *E. coli* were also detected in the milk. The results did not indicate the existence of inflammation but the subsequent contamination of milk with microorganisms. Milking hygiene needs to be improved in order to obtain high quality milk.

Keywords: hygienic quality, somatic cells, microorganisms, mastitis, Pag sheep

1. UVOD

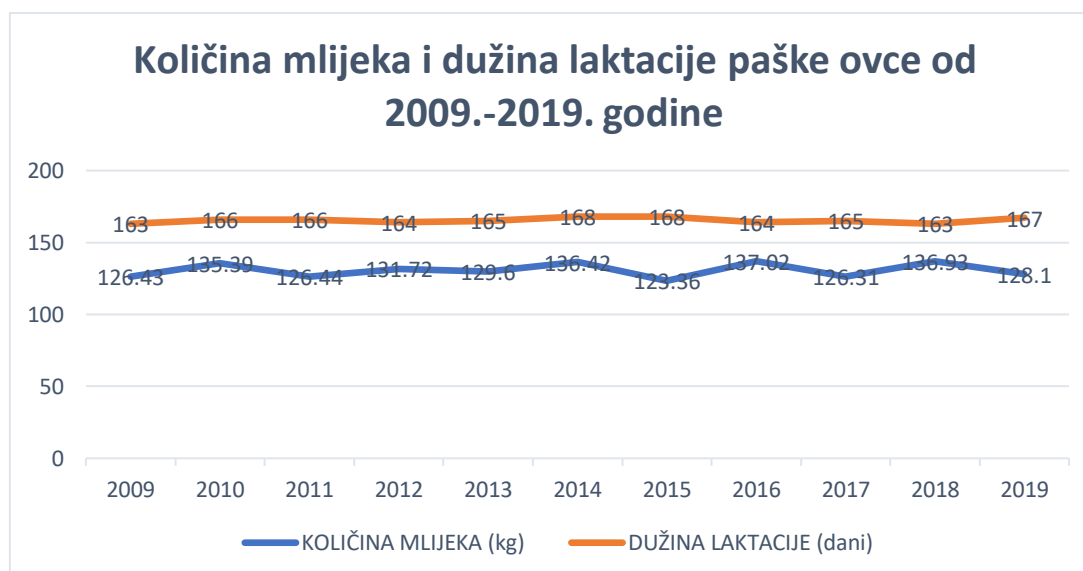
Na Pagu se danas nalazi oko 20 000 paških ovaca koje se koriste za proizvodnju mlijeka te se to mlijeko prerađuje u poznati paški sir. Ovce se ondje uzgajaju ekstenzivno, na siromašnim pašnjacima, a mužnja je u većini slučajeva ručna. Paška ovca je autohtona Hrvatska pasmina nastala na istoimenom otoku Pagu. Ova ovca je nastala križanjem otočke pramenke i merina, odnosno merino Negretti i Bergamo ovnova, a smatra se da je njezino formiranje počelo 1870. godine. Pašku ovcu odlikuje čvrsta i skladna građa tijela, visine u grebenu do 56, odnosno 63 cm, a težine oko 43 kg. Glava paške ovce je srednje velika, plemenitog izgleda, ravnog profila kod ovaca, dok je kod ovnova profil ispupčen. Ovnovi imaju čvrste, dobro razvijene rogove, ali to nije uvijek slučaj. Oči su velike i živahne, a uši srednje velike te polustršeće. Vrat je srednje dug i mišićav. Paška ovca spada u dugorepe pasmine ovaca s repom koji seže ispod skočnog zgloba te ne postoji praksa skraćivanja repova. Noge su čvrste i jake te dobro koordinirane što priliči krškim uvjetima na otoku. Vuna paške ovce je zatvorena do poluotvorena bijelo obojena. Među grlima prevladava bijela boja te se mogu naći i crna i siva grla, iako rijetko. Danas se paška ovca najčešće pripušta od srpnja do rujna, odnosno ranije nego u prošlosti (od rujna do listopada), a janjenje se odvija od kraja prosinca do veljače (Mioč i sur., 2007). Janji se jednom godišnje te ojanji jedno janje. Janjad siže u prosjeku mjesec do mjesec i pol dana, odnosno ako je za remont stada do 40-45 dana, dok se ostatak janjadi odbija s 30-35 dana. Odbijena janjad je 9 – 15 kg tjelesne mase. Nakon odbića mlijeko se prerađuje u sir, a janjad se kolje te se dobiva poznata paška janjetina. Od procijenjenih 20 000 ovaca samo je 5 470 uzgojno valjano (HAPIH, 2019), a registriran je 51 uzgajivač paške ovce. Paška ovca se uglavnom uzgaja u stadima od oko 100 grla, što se nije značajno mijenjalo u zadnje dvije godine istraživanja HAPIH-a (2019).



Slika 1.1. Paške ovce na pašnjaku (lijevo); Ručna mužnja u toru (desno)

Izvor: A. Kostelić

Paška ovca u 170 dana laktacije proizvede 130 litara mlijeka sa 7,40% mliječne masti i 5,90% proteina (HAPIH, 2019). Od ukupne količine mlijeka u laktaciji janjad posiže oko 24% mlijeka (31,60 litara), što je više nego tijekom istraživanja Pandek i sur. (2005) koji su zaključili da je ta količina 13%, odnosno 17,50 litara mlijeka. Od mlijeka paške ovce proizvede se 220 tona paškog sira, a od toga 60 tona na tradicionalan način na obiteljskim gospodarstvima (Barać i sur., 2008). Na Grafu 1.1. prikazano je kretanje količine mlijeka i dužina laktacije kroz desetogodišnje razdoblje (2009. – 2019. godine).



Graf 1.1. Kretanje količine mlijeka i dužine laktacije paške ovce kroz desetogodišnje razdoblje

Izvor: HPA i HAPIH, 2009-2019

Paška ovca se u većini slučajeva kroz cijelu godinu drži na pregonskim pašnjacima na kojima postoji određeni prostor za skrivanje od nevremena. Sukladno ovakvom držanju ovce se muzu ručno u takozvanim torovima ili na pašnjacima u posebnom ograđenom prostoru te se mužnja odvija u kante. Usprkos dokazanom pozitivnom učinku na higijenu mlijeka i mliječnost životinje, tijekom mužnje ovaca na Pagu, uglavnom ne postoji nikakva priprema vimena pa se tako ne vrši pranje niti dezinfekcija vimena, a jedina priprema koju mužači vrše je izmuzivanje prvih mlazova mlijeka. Upravo iz toga razloga higijena takvog mlijeka je upitna. U mlijeko tijekom mužnje dopijeva prljavština, odnosno balega, dlake, slama, koja na sebi nosi velik broj mikroorganizama koji onečišćuju mlijeko. Takvo mlijeko prvenstveno zbog proteolitičkih i lipolitičkih enzima bakterija ima slabija preradbena svojstva, ali veći problem je taj što takva nehigijenska mužnja često dovodi do mastitisa jer manipulacijom ovcama mužači prenose različite nečistoće na vime te mikroorganizmi zatim ulaze kroz sisni kanal. Ovakav nehigijenski način mužnje može biti i ozbiljan izvor zaraze za ljude – zoonoza.

Iz svega do sada navedenog može se vidjeti da postoji nekoliko propusta u uzgoju i proizvodnji koji mogu doprinijeti lošijoj higijenskoj kvaliteti mlijeka. Ne provodi se kupiranje repova pa je teži pristup vimenu, a s repa spada velika količina prljavštine u kantu te na taj način velik broj mikroorganizama dopijeva u mlijeko. Također zbog izostavljanja pripreme vimena prije mužnje može lako doći do ulaska mikroorganizama s površine vimena u unutrašnjost što može uzrokovati mastitis životinja. Upravo zbog ovoga cilj rada je utvrditi higijensku kvalitetu sirovog mlijeka paške ovce, odnosno utvrditi ukupan broj mikroorganizama te somatskih stanica. U radu će također biti provedena determinacija mikroorganizama uzročnika mastitisa, odnosno patogenih mikroorganizama.

2. SOMATSKE STANICE U OVČJEM MLIJEKU

Somatske stanice su prirodno prisutne stanice koje se nalaze u mlijeku kao rezultat sekrecije mlijeka, odnosno to su stanice imunosnog sustava te istrošene epitelne stanice koje potječu iz alveola, cisterne vimena i sisne cisterne. Fiziološki omjer ove dvije vrste stanica je 80% imunosne stanice te 20% epitelne, a kada dođe do bilo kojeg patološkog procesa, odnosno prodora bakterija u vime taj se omjer mijenja. Ovaj podatak podupiru i Boutinaud i Jammes (2002) u svom radu gdje navode da je udio epitelnih stanica 26%. Prema Gonzalez-Rodriguez i sur. (2011) u mlijeku zdravih ovaca od imunosnih stanica nalazi se 46-84% makrofaga, koji su ujedno i dominantni, 2-28% polimorfonuklearnih stanica, 11-20% limfocita te 1-2% epitelnih stanica. Iz ovoga proizlazi da su somatske stanice pokazatelj zdravlja životinja, a prvenstveno zdravlja mliječne žlijezde. Broj somatskih stanica varira ovisno o više faktora (Vasileiou i sur., 2018a):

- vrsti, pasmini, individualnim karakteristikama životinje,
- dnevnim varijacijama,
- stadiju laktacije,
- genetici, morfologiji vimena,
- zdravlju i stresu, sezoni,
- intervalima i higijeni mužnje,
- upravljanju stadom.

2.1. Utjecaj različitih faktora na broj somatskih stanica

Čačić i sur. (2003) su čimbenike koji utječu na broj somatskih stanica podijelili na genetske i okolišne čimbenike. Genetski čimbenici se mogu kontrolirati kroz selekciju, ali heritabilitet za broj somatskih stanica je malen pa je selekcijski napredak izrazito spor. Drugi način smanjenja broja somatskih stanica je preko selekcije na morfologiju vimena. Pri tome je potrebno obratiti pažnju na dubinu vimena te širinu i dubinu sisa.

S obzirom na okolišne čimbenike na broj somatskih stanica utječe infekcija vimena, dob životinje, stadij i redoslijed laktacije, način držanja, sezona, pasmina, stres te način i higijena mužnje. Kao jedne od najvažnijih okolišnih čimbenika povećanja broja somatskih stanica može se navesti čovjeka koji je odgovoran za dobrobit životinja pa je izrazito bitna edukacija uzgajivača.

Infekcija vimena, odnosno mastitis najvažniji je čimbenik koji utječe na povećanje broja somatskih stanica. Ovisno o patogenu koji je inficirao vime i o trajanju infekcije broj somatskih stanica može biti i do nekoliko milijuna. Ne postoji pravilnik prema kojemu je propisan maksimalan dopušteni broj somatskih stanica u ovčjem mlijeku, ali Tančin i sur. (2017) su u svom istraživanju zaključili da je najveći udio ovaca, njih 82%, s brojem somatskih stanica ispod 400 000 stanica/mL, dok je tek 8,90% ovaca bilo s brojem somatskih stanica iznad

1 000 000 stanica/mL. Ovi autori također navode da je zbog ovakvog udjela životinja razlog povećanog broja somatskih stanica najvjerojatnije subklinički mastitis, a ne fiziološki razlog.

Postoje različite vrste mastitisa ovisno o trajanju i kliničkoj slici upale. Tako razlikujemo akutni i kronični mastitis te klinički i subklinički mastitis o čemu će više biti riječi u poglavlju 3.

Dob životinje i redoslijed laktacije su povezani pa se ova dva parametra promatraju zajedno. Dob životinje je proporcionalna udjelu infekcija vimena. Starije životinje su duže izložene različitim mikroorganizmima pa je i veća inficiranost kod starijih grla. Paape i sur. (2001) su došli do zaključka da se broj somatskih stanica povećava između prve i četvrte laktacije, odnosno starije ovce, one s većim brojem laktacija imaju veći broj somatskih stanica.

Stadij laktacije je izrazito važan parametar kod varijacija broja somatskih stanica te najvažniji fiziološki uzrok povećanja broja somatskih stanica. Prema Paape i sur. (2001) broj somatskih stanica je najveći na dan poroda. Smanjenje broja se događa tijekom prijelaza kolostruma u mlijeko, a najmanji broj somatskih stanica je tijekom petog tjedna laktacije kada je količina mlijeka najveća. Odnosno ovi autori su zaključili da se broj somatskih stanica značajno smanjuje u prvih pet tjedana laktacije, s 596 000/mL prvi dan laktacije na 30 000/mL u vrhu laktacije te se broj ne mijenja do kraja laktacije. Međutim, Sevi i sur. (1999.) navode da do fiziološkog povećanja broja somatskih stanica dolazi na početku i kraju laktacije.

Bendelja Ljoljić i sur. (2018) u svom istraživanju **sezonskih** varijacija proizvodnje i kakvoće mlijeka mediteranskih ovaca utvrdili su da je najveći broj somatskih stanica u mlijeku paške ovce bio tijekom lipnja (209 000/mL), a najmanji tijekom ožujka (151 000/mL). Isti autori također navode da je najveći prosječni broj somatskih stanica (205 000/mL) bio tijekom 2014. godine koja je bila ekstremno topla i kišovita.

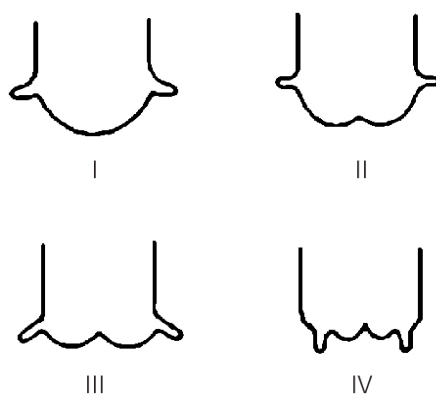
Način mužnje je također bitan kada govorimo o broju somatskih stanica. Ručna mužnja je rizična po pitanju osobne higijene mužača kada on postaje izvor infekcije, ali može prenijeti uzročnike i s ovce na ovcu. Kod strojne mužnje muzna jedinica može biti značajan izvor infekcije, ali i istrošene sisne gume, kao i preveliki vakuum mogu uzrokovati ozljede vimena i sisa. Ovakvo vime je podložno različitim infekcijama koje opet uzrokuju povećanje broja somatskih stanica. **Dnevne varijacije** u broju somatskih stanica su također izražene pa je tako broj somatskih stanica povećan sat vremena nakon mužnje (Paape i sur., 2001).

Način držanja, odnosno mikroklima, ali i higijena smještaja je bitna za higijensku kvalitetu mlijeka. Pri tome posebnu pažnju treba posvetiti temperaturi, protoku zraka te relativnoj vlažnosti. Kod loših mikroklimatskih čimbenika životinja je pod **stresom**, dolazi do smanjenja opće otpornosti organizma pri čemu je životinja podložnija različitim infekcijama te posljedično tomu broj somatskih stanica se povećava.

Mliječne **pasmine** zbog genetske predispozicije stvaraju velike količine mlijeka. Stvaranjem mlijeka organizam životinje je pod velikim stresom te pada opća otpornost organizma i dolazi do infekcija. Opće je poznato da su visoko mliječne životinje, upravo iz tog

razloga, podložnije oboljenjima od životinja koje stvaraju manje količine mlijeka, odnosno autohtonih pasmina te pasmina za proizvodnju mesa i vune.

Morfologija vimena ima velik utjecaj na zdravlje vimena, odnosno na broj somatskih stanica u mlijeku. Tako je utvrđeno da ovce koje imaju vodoravno položene sise imaju veći broj somatskih stanica u mlijeku (tip I i tip II, Slika 2.1.1.) (Vrdoljak i sur., 2020). Do ovoga dolazi jer je teže izmuzivanje takvog vimena pa može doći do zaostajanja mlijeka i nastajanja infekcija. Ovako postavljene sise stvaraju problem i kod strojne mužnje jer dolazi do savijanja sisa pod težinom sisnih čaški (Pourlis, 2019). Sagi i Morag (1974, cit. Kastelic i Kavčić, 1994) navode da je vime tipa I i II nepoželjno za strojnu mužnju jer uzrokuje lošiju muznost i dužu mužnju, a selekcijom se došlo do oblika vimena tipa III i IV čime se poboljšala mliječnost i smanjilo vrijeme mužnje (Mikuš, 1982, cit. Kastelic i Kavčić, 1994). Kastelic i Kavčić (1994) u svom istraživanju veze između morfologije vimena, mliječnosti i strojne mužnje ovaca u Sloveniji došli su do zaključka da je u mlijeku ovaca s vimenima tipa III i tipa IV između 100 000 i 500 000 somatskih stanica/mL. Također, kod ovaca koje imaju dublje vime te duže sise ili obješeno vime takvo vime je bliže tlu te je veća vjerojatnost mehaničkih ozljeda i lakši je prodor mikroorganizama u vime.



Slika 2.1.2. Različiti tipovi vimena ovaca

Izvor: Sagi i Morag (1974)

Čovjek ima najvažniju ulogu u održavanju zdravlja stada i higijene mlijeka. Uzgajivač utječe na način držanja životinje, način mužnje i higijenu mužnje te osobnu higijenu te na taj način indirektno utječe na povećanje ili smanjenje somatskih stanica u mlijeku.

U svom istraživanju utjecaja **upravljanja stadom** na broj somatskih stanica u skupnom mlijeku Barkema i sur. (1998) su zaključili da su najbitnije stavke u upravljanju stadom postupci tijekom mužnje, stroj za mužnju, postupci tijekom i nakon mužnje postupci u prevenciji i liječenju mastitisa, terapija zasušenih krava i slično. Općenito čistoća i njega stada postupci prije, tijekom i nakon mužnje i prevencija bolesti bili su najbolji u stadu s najmanjim brojem somatskih stanica. Posljedično tomu, autori su također zaključili da je stado s manjim brojem somatskih stanica (<150 000) imalo prosječno veću proizvodnju mlijeka što je iznosilo 8 589kg dok je stado s većim brojem somatskih stanica (251 000 – 400 000) imalo prosječnu proizvodnju mlijeka od 8 072kg.

2.2. Tipovi somatskih stanica

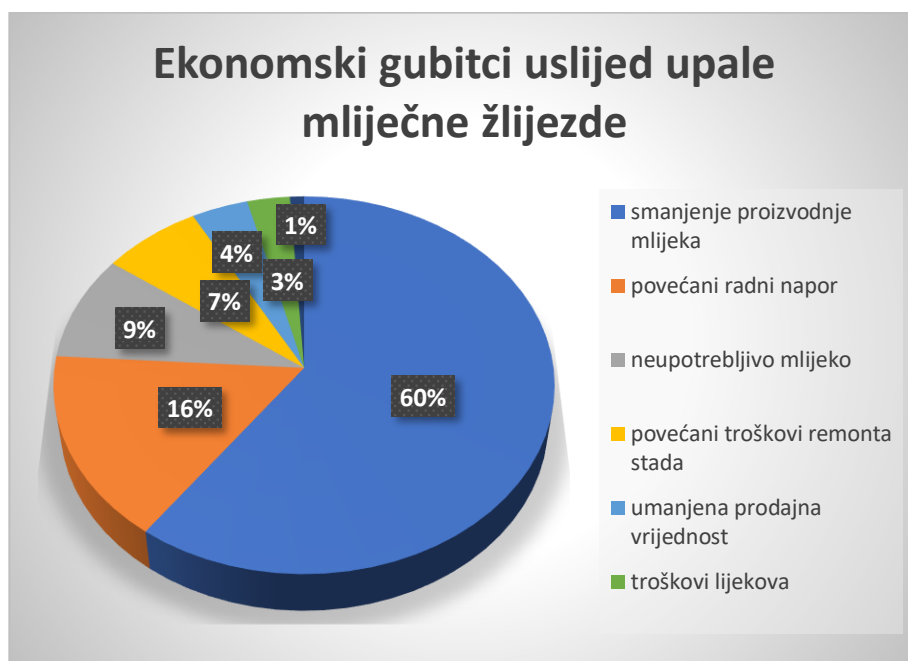
Somatske stanice u mlijeko dopijevaju kao rezultat obrane vimena od patogena koji ulaze u organizam i uzrokuju patološke promjene tkiva. Kao što je već navedeno somatske stanice se sastoje od imunosnih stanica i epitelnih stanica, a svaka vrsta imunosnih stanica ima svoju svrhu u organizmu pa tako postoji određeni redoslijed djelovanja tih stanica.

Makrofagi su prve stanice koje prepoznaju bakteriju u organizmu, nakon čega na mjesto upale dolaze polimorfonuklearne stanice potaknute kemoatraktantima koje otpuštaju makrofagi te dolazi do fagocitoze mikroorganizama, a limfociti su zaslužni za specifično prepoznavanje antigena i stvaranje antitijela (Li i sur., 2014). Za početak ovakvog odgovora organizma ključnu ulogu imaju citokini. To su glasnici koje tjelesne stanice otpuštaju tijekom infekcije. Citokini sudjeluju u međustaničnoj komunikaciji te na taj način pomažu u imunosnom odgovoru te povećavaju fagocitoznu sposobnost imunosnih stanica, a posebno su važni za funkcioniranje leukocita.

Dok je kod krava sekrecija mlijeka merokrina, kod ovaca mlijeko nastaje apokrinim načinom sekrecije. Zbog ovoga kod ovaca također postoje citoplazmatske čestice. To su anuklearne čestice s apikalne površine sekretornih stanica mliječne žlijezde. Ove čestice su veličinom slične somatskim stanicama u mlijeku te sadrže proteine, masti i kazeinske micelle (Boutinaud i Jammes, 2002). Zbog veličine slične somatskim stanicama, detekcija citoplazmatskih čestica je otežana. Međutim, Paape i sur. (2001) navode da je u ovčjem mlijeku oko 15 000/mL ovih čestica.

3. UPALA MLIJEČNE ŽLIJEZDE (lat. *mastitis*)

Upala mliječne žlijezde (lat. *mastitis*) nastaje prodorom bakterija u vime te od njega najčešće obolijevaju muzne životinje. Mastitis čini velike štete u stočarstvu, ali i u preradbenoj industriji. Štete, odnosno ekonomski gubitci koji nastaju uslijed mastitisa su prikazani na Grafu 3.1.



Graf 3.1. Ekonomski gubitci uslijed upale mliječne žlijezde

Izvor: Rupić, 2010

Smanjenje mliječnosti te neupotrebljivost mlijeka su jedni od najvećih problema koji se javljaju uslijed mastitisa. Mlijeko mastitičnih životinja ima promijenjen kemijski sastav, organoleptička svojstva te sadrži velik broj mikroorganizama te iz tih razloga nije prikladno za ljudsku prehranu, hranidbu teladi niti za preradu već se mora neškodljivo ukloniti. S obzirom na zdravlje životinja i izgled mlijeka mastitis se može podijeliti na subklinički (skriveni) i klinički (vidljivi). Subklinički mastitis je učestaliji i pravi veće štete od kliničkog oblika. Uzroci mastitisa mogu biti različiti, a najčešće se dijele na pogodne čimbenike i neposredne uzročnike upale (Rupić, 2010).

Pogodni čimbenici su najčešće loša higijena mužnje, životinja i štale te mikroklima, nepravilna hranidba i mužnja te kvarovi i neprikladni tlak stroja za mužnju. Kod nepravilne strojne mužnje najčešći problemi su prevelik vakuum, neodgovarajući broj i izmjena taktova, odnosno neodgovarajuća masaža sisa te preduga mužnja, odnosno mužnja na prazno. Uslijed navedenoga dolazi do mehaničkog oštećenja cisterne i sise pri čemu se povećava broj somatskih stanica, sa ili bez pozitivnog bakteriološkog nalaza. Ovakvi kvarovi dovode do

povećanog rizika od mastitisa. Oni uzrokuju ozljede sisa te uklanjanje zaštitnog sloja pri čemu bakterije mogu lakše doprijeti u vime i uzrokovati upalu. Zbog neprikladnog tlaka u stroju za mužnju također može doći do ispadanja sisne čaše pri čemu se ona uprlja fecesom i drugim nečistoćama s poda, a na taj način se mogu prenijeti različiti mikroorganizmi u vime. Tijekom strojne mužnje mikroorganizmi se mogu prenijeti s jedne životinje na drugu preko sisnih guma. Iz ovog razloga potrebno je životinje s upalom musti na kraju kako bi se smanjio rizik zaraze ostatka stada. Izrazito bitno kod strojne mužnje je i dezinfekcija sisa nakon mužnje. Nakon mužnje sisni kanal je još neko vrijeme otvoren, a tijekom mužnje je uklonjen keratin koji ima antibakterijsko djelovanje pa je poželjno nanijeti sloj koji će štititi vime dok se sisni kanal ne zatvori i ne stvori novi prirodni zaštitni sloj.

Tijekom nepravilne ručne mužnje, najčešće zbog istezanja sisa, dolazi do pucanja sluznice mliječne žlijezde i nastaje upala vimena. Nepotpunom mužnjom u vimenu ostaje rezidualno mlijeko koje dovodi do razvoja mikroorganizama te do upale. Međutim, najveći problem je nehygienična mužnja kada se ne vrši pranje i brisanje sisa prije mužnje, ako se koriste onečišćene krpe, oprema i pribor te sustav za mužnju. Čovjek ima veliku ulogu u prijenosu uzročnika mastitisa ako su mu ruke oštećene, odnosno ima ispucanu kožu. U takvim pukotinama se nakuplja prljavština i mikroorganizmi koji se onda sa zaraženog vimena mogu prenijeti na zdravo. Ako ovce leže na prljavom ležištu na vuni se nalazi velik broj nečistoća – prašina, zemlja, trava, izmet koji sadrže različite mikroorganizme, a tijekom ručne mužnje preko ruku mužača oni dospijevaju u vime, ali i u kante s mlijekom. Neuravnotežena hranidba je također jedan od čimbenika nastanka mastitisa. Kod neuravnotežene hranidbe dolazi do stresa, pada opće otpornosti organizma, a životinja je sklonija upalama. Mehaničke ozljede vimena kao i ubodi kukaca dovode do probijanja kože vimena te se stvaraju putevi ulaska mikroorganizama koji uzrokuju mastitis.

Neposredni uzročnici upale su mikroorganizmi. To mogu biti virusi, gljivice-kvasci i plijesni te njihovi toksini, ali najčešći uzročnici su bakterije. Mikroorganizmi se nalaze na podu i u zraku, odnosno u fecesu i prašini te na taj način dospijevaju na dlaku životinja i u vime. Oni u vime mogu dospjeti na više načina: kroz povrede na koži vimena i sisa, krvlju ili limfom s bilo kojeg mjesta u organizmu, a najčešće je to kroz sisni kanal. Ulaskom bakterija u vime, one se razmnožavaju, a svojim toksinima oštećuju epitel te uzrokuju upalu. Posljedično tomu dolazi do obrambene reakcije te se povećava broj somatskih stanica.

3.1. Subklinička upala mliječne žlijezde

Smanjena proizvodnja mlijeka je najveći problem koji se javlja tijekom mastitisa te je to glavni pokazatelj subkliničkog mastitisa. Tijekom subkliničkog mastitisa, osim smanjenja količine mlijeka, nema drugih promjena na vimenu ili u mlijeku. Ovaj oblik mastitisa se može otkriti provođenjem mastitis testa, ali s obzirom da ovce imaju fiziološki veći broj somatskih stanica od krava kod njih je potrebno osim utvrđivanja broja somatskih stanica napraviti i bakteriološku pretragu. Marco (1994) te Contreras i sur. (1997) (cit. Gonzalo i sur., 2002) navode da se uzorak smatra pozitivnim na subklinički mastitis ako sadrži 250 kolonija/mL 5 ili više bakterija ili više od 50 kolonija/mL *Staphylococcus aureus*. Olives i sur. (2020) navode da su individualni gubitci mlijeka tijekom subkliničkog mastitisa 2,6 – 43,1%. Ovi gubitci ovise o više faktora, a to su:

- jačina upale
- stupanj proizvodnje
- uzročnici infekcije – najčešći uzročnici subkliničke infekcije su stafilocoki, točnije koagulaza negativni stafilocoki. Oni uzrokuju različito povećanje somatskih stanica, a prema patogenosti se mogu svrstati između minor i major uzročnika mastitisa jer uzrokuju smanjenje mliječnosti za 4-5%
- jednostrana ili obostrana infekcija.

Utvrđeno je da nakon početka infekcije dolazi do značajnog smanjenja mliječnosti unutar jednog tjedna (Olives i sur., 2020). U istom istraživanju autori navode kako je smanjenje mliječnosti konstantno idućih 7 tjedana, ako je mastitis nastupio tijekom laktacije, dok mastitis koji je prisutan od janjenja može biti znatno pogoršan u smislu smanjenja količine mlijeka.

Leitner i sur. (2019) u svom radu navode da je udio subkliničkog mastitisa 5-50%, dok je klinički oblik vrlo rijedak. Međutim, Albenzio i sur. (2019) su u svom radu došli do zaključka da je taj udio kod malih preživača tek 5-30%. Leitner i sur. (2019) također navode da su bakterije koje uzrokuju veće subkliničke infekcije *E. coli*, streptokoki, *S. aureus* i koagulaza negativni stafilocoki i to kao jedini mikroorganizmi. Isti autori navode da su gubitci mliječnosti tijekom subkliničkog mastitisa do 8%, s prosjekom 4-8% jer neinficirana polovica kompenzira većom proizvodnjom mlijeka. Ovu tvrdnju podupiru i Olives i sur. (2020) koji navode da neinficirana polovica vimena kompenzira 6,60% većom proizvodnjom mlijeka

Povećan broj somatskih stanica ne mora biti isključivo uzrokovan prodorom mikroorganizama u vime, već može biti uzrokovan imunosnim odgovorom bilo gdje u organizmu, a uzrok može biti različit. Povećanje broja somatskih stanica je zapravo odgovor imunosnog sustava organizma na patogene koji prodiru u vime i uzrokuju upalnu reakciju. Albenzio i sur. (2011) navode da je korisna metoda za otkrivanje subkliničkog mastitisa diferencijacija pojedinih somatskih stanica. U mlijeku zdravih ovaca dominiraju makrofagi, a kod mastitisa dolazi do povećanja udjela polimorfonuklearnih leukocita (Albenzio i sur. (2011), Albenzio i Caroprese (2011)). Ovu tvrdnju podupiru Vasileiou i sur. (2018a, 2018b) koji su

zaključili da tijekom mastitisa, osim što dolazi do povećanog broja somatskih stanica, dolazi i do povećanja broja polimorfonuklearnih stanica i limfocita na više od 65%. U ovaca broj somatskih stanica može biti i do 60 000 000/mL bez kliničkih simptoma i vidljivih promjena u mlijeku (Paape i sur., 2001). Isti autori navode da je kod smanjenog broja somatskih stanica (do 500 000/mL) udio polimorfonuklearnih leukocita 40%, dok je kod povećanog broja somatskih stanica (iznad 1 000 000/mL) njihov udio 57%. Vasileiou i sur. (2018a) su istraživali pojavnost subkliničkog mastitisa u stadima ovaca u Grčkoj i zaključili su da je pojavnost ove vrste mastitisa 26%, s udjelom u pojedinim stadima do čak 85%, dok u nekim stadima nije bilo slučajeva mastitisa.

3.1.1. Čimbenici koji utječu na pojavu subkliničke upale mliječne žlijezde

Postoje određeni čimbenici koji mogu životinju učiniti podložniju mastitisu, a prema Vasileiou i sur. (2018a) to su:

- **Način uzgoja** – autori su zaključili da je subklinički mastitis najčešći u poluintenzivnom i intenzivnom uzgoju nego poluekstenzivnom ili ekstenzivnom uzgoju.
- **Stadij laktacije** – veća pojavnost subkliničkog mastitisa je tijekom 2. mjeseca laktacije te 5., nego u ostalim mjesecima laktacije. Rezultati su također pokazali da je tijekom ovih mjeseci najčešći uzročnik *Staphylococcus spp.*, dok je tijekom prvog mjeseca laktacije najčešći izolirani uzročnik bio *E. coli*.
- **Pasmina** – visokoselekcionirane mliječne pasmine ovaca su podložnije mastitisu od pasmina za proizvodnju mesa ili vune. Mliječne pasmine su zbog visoke proizvodnje mlijeka pod stalnim stresom te zbog toga imaju manju opću otpornost i lakše obolijevaju od mastitisa, ali i drugih bolesti
- **Mužnja** – autori nisu uočili značajnu razliku u pojavnosti subkliničkog mastitisa u ovaca muženih ručno ili strojno, ali su zaključili da je veća pojavnost stafilokokne infekcije kod strojne mužnje. Također su utvrdili da je dezinfekcija nakon mužnje uvelike utjecala na pojavnost mastitisa.

3.2. Klinička upala mliječne žlijezde

Klinički mastitis je ozbiljan problem u stočarskoj proizvodnji. Za razliku od subkliničkog mastitisa životinje s kliničkim mastitisom pokazuju znakove infekcije pa je ova vrsta mastitisa lakše uočljiva, ali i dalje stvara velike probleme. Kod kliničkog mastitisa često dolazi do djelomičnog ili potpunog propadanja sekretornog tkiva vimena čime se trajno smanjuje mliječnost. Tijekom infekcije životinja ne dozvoljava dodirivanje vimena pa je otežana mužnja, u takvom mlijeku su vidljive promjene i ono nije za uporabu ili preradu. Veliki su troškovi liječenja, a dolazi do smanjenja mliječnosti pa se liječenje ne provodi već se bolesne životinje izlučuju iz stada. Također janjad takvih ovaca ima slabiji prirast, a može doći i do uginuća.

Neki od znakova kliničkog mastitisa su temperiranost vimena, natečenost, bolnost, modro-crvena boja kože vimena, smanjena mliječnost, ugrušci, krv i sluz u mlijeku, vodenasto mlijeko. Također dolazi do općih znakova bolesti, a najčešći je povišena tjelesna temperatura. U krajnjem slučaju može uzrokovati gangrenu vimena koja se očituje plavom bojom kože i hladnim vimenom te otpadanjem jedne ili obje polovice.

Mørk i sur. (2007) navode da je za mastitis ovaca odgovorno 20-30 bakterijskih vrsta, najčešći su *S. aureus*, *Mannheimia haemolytica*, *Streptococcus uberis* i *E. coli*. U ovaca koje su imale jednostrani klinički mastitis u 40% slučajeva *S. aureus* je bio prisutan i u drugoj polovici koja nije pokazivala znakove upale. *S. aureus* je također bio prisutan u 14% slučajeva i u naizgled zdravoj polovici kod ovaca kojima je utvrđena jednostrana klinička infekcija nekom drugom bakterijom. Isti autori su došli do zaključka da je u 8,8% ovaca došlo do gangrene vimena, a od toga je u 73% slučajeva uzročnik bio *S. aureus*, 6% *Clostridium perfringens* te 2% *Arcanobacterium pyogenes*.

3.3. Oblici upale mliječne žlijezde

Mastitis se može manifestirati na različite načine ovisno o uzročniku te o imunosnom sustavu domaćina. Tako se prema intenzitetu upale mastitis može podijeliti na poremećaj sekrecije, latentnu infekciju, kataralnu upalu, akutnu žljezdanu upalu te gnojnu upalu, dok se kod ovaca najčešće javljaju akutne žljezdane (gangrenozne i flegmonozne) upale te rijetko kataralne upale (Rupić, 2010).

3.3.1. Akutna žljezdana upala

Akutna žljezdana upala je upala žljezdanog tkiva vimena pri čemu dolazi i do poremećaja općeg stanja životinje. Ovaj oblik upale uzrokuje velike ekonomske gubitke, ali i smrt. Akutna upala nastaje zbog loše higijene smještaja i mikroklima, zbog nepravilne mužnje i različitih povreda vimena i sisa. Najčešći uzročnici akutne upale su *S. aureus*, koagulaza negativni stafilokoki, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Fusobacterium necrophorum*, koliformni mikroorganizmi – *E. coli*, *Enterobacter spp.*, *Aerobacter spp.* Akutna upala se javlja kao flegmonozna, gangrenozna i nekrotična upala. Zajedničko svim ovim oblicima je pogoršanje općeg zdravstvenog stanja životinje pri čemu dolazi do povišene tjelesne temperature, ubrzanog daha i disanja, javlja se atonija buraga, apatičnost, opća slabost, ovca hoda raširenih nogu te zaostaje za stadom. Mlijeko je promijenjeno kao i vime, a na vimenu se pojavljuju apscesi koji pucaju i iz njih se cijedi gnoj. U krajnjim slučajevima može doći do endotoksičnog šoka i septikemije te životinja ugiba.

Flegmonozna upala počinje naglim pogoršanjem zdravstvenog stanja životinje, dolazi do povećanja tjelesne temperature, ubrzanog daha i disanja, životinja gubi apetit, ima proljev. Javlja se slabost pa životinja teško hoda i ustaje ili dolazi do oduzetosti stražnjeg dijela tijela te su povećani nadvimni limfni čvorovi. Vime je otečeno, bolno, temperirano i crveno, a iz vimena se izmazuje patološki sekret sličan pivu ili krvnom serumu.

Gangrenozna upala se pojavljuje naglo, životinja je apatična, tjelesna temperatura se povećava, ali nakon nekoliko sati se smanjuje ispod donje fiziološke granice. Vrlo brzo dolazi do promjena na vimenu, ono postaje crvenoplavo, a na opip je vlažno i hladno. U oboljelim polovicama se uočava vrlo malo sekreta koji sadrži krvave ugruške te komadiće nekrotičnog tkiva. Bolest brzo napreduje, već nekoliko sati nakon pojave ovca je bez svijesti i brzo ugiba.

Nekrotična upala uglavnom je akutnog tijeka. Počinje naglo tako što dolazi do promjene boje vimena ili polovice u plavu s naglašenom granicom, a na koži oboljelog dijela izlazi tkivna tekućina. Oboljeli dio otvrdne i za nekoliko dana (akutni oblik) do nekoliko tjedana (kronični oblik) otpadne, ovisno o uzročniku. Ako je životinja gravidna nekoliko dana nakon pojave upale može pobaciti. *C. perfringens* je česti uzročnik nekrotične upale koji uzrokuje uginuće životinja.



Slika 3.3.1.1. Nekrotična upala jedne polovice vimena ovaca

Izvor: <https://www.thescottishfarmer.co.uk/livestock/sheep/14367448.mastitis-at-its-worst/>

Sve akutne upale se lako dijagnosticiraju prema znakovima bolesti. Pomoć životinjama je potrebno pružiti u kratkom roku, ali u našim uvjetima životinje s kliničkim znakovima upale se ne liječe, već se usmrćuju.



Slika 3.3.1.2. Normalno mlijeko i sekret iz gangrenoznog vimena

Izvor: <https://u.osu.edu/sheep/2018/01/23/mastitis-in-small-ruminants/>

3.3.2. Kataralna upala

Kataralna upala je upala površinskog sloja sluznice cisterne vimena i mliječnih kanalića te alveola žljezdanog dijela, a može biti akutnog ili kroničnog tijeka.

Akutna kataralna upala nastaje nakon pada opće otpornosti organizma uslijed stresa uzrokovanog lošom higijenom držanja, lošom mikroklimom, neizbalansiranom hranidbom ili pogrešnom mužnjom. Prilikom pada opće otpornosti već postojeće latentne infekcije koje do tada nisu bile vidljive prelaze u vidljivu kataralnu upalu s razvijenim simptomima. Uzročnici akutne kataralne upale su virusi, bakterije (*Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *S. aureus*, koagulaza negativni stafilokoki, *E. coli*, *P. aeruginosa*, mikoplazme) te gljivice i njihovi toksini. Tijekom akutne kataralne upale simptomi se brzo razvijaju. Dolazi do pogoršanja općeg zdravlja životinje, ima povišenu tjelesnu temperaturu, gubi apetit i ne preživa. Zaražena polovica ili cijelo vime je otečeno, bolno i toplije, a ovca je na dodir nemirna. Mlijeko iz oboljelog vimena je najčešće promijenjeno samo u prvim mlazovima, u kojima se uočavaju krpice gnoja, ugrušci mlijeka i krv, a kasnije je ono normalno. Bolest se otkriva na osnovu kliničkih znakova i izgleda mlijeka.

Kronična kataralna upala stvara najviše štete u stočarstvu od svih do sada navedenih oblika upale. Ova vrsta upale se sporo i neprimjetno širi po vimenu te na kraju obolijeva cijela sluznica cisterne vimena, mliječnih kanalića i alveole. Pogodni čimbenici za nastanak kroničnih upala su isti kao kod akutnih kataralnih upala, ali i nepravilna i nepotpuna mužnja, nepravilnosti u građi vimena te povrede vimena, a jedan od velikih utjecaja na nastanak ove upale je čovjek zbog nepravilnog uzgoja životinja te neprimjeravanja higijenskih načela tijekom mužnje. Uzročnici ove upale su isti kako i kod akutne kataralne upale, ali ovdje se još mogu pojaviti i *Klebsiella spp.*, *C. perfringens*, *Mannheimia haemolytica*, *A. pyogenes* te *Mycobacterium spp.*, *Brucella abortus*, *Salmonella spp.*, odnosno pojavljuje se i tijekom zaraznih bolesti. Tijekom kronične kataralne upale opće stanje životinje nije promijenjeno, nadvimni limfni čvorovi nisu povećani, nema patoloških promjena na vimenu te je mlijeko također nepromijenjeno. Ako se bolest ne otkrije i potraje dugo dolazi do atrofije žljezdanog tkiva te se u vimenu mogu napipati zadebljanja i čvorići zbog prelaska žljezdanog u vezivno tkivo. Napredovanjem upale može doći do promjene organoleptičkih svojstava mlijeka, ono prvo postaje slankasto, zatim vodenasto te se smanjuje količina mlijeka, a u krajnjim slučajevima u mlijeku se uočavaju krpice gnoja i grudice te dolazi do potpune atrofije i prestanka izlučivanja mlijeka.

3.4. Akutna i kronična upala mliječne žlijezde

S obzirom na vrijeme nastanka simptoma, mastitis se može podijeliti na akutni i kronični mastitis. Ovisno o tome pojavljuju se i određeni, specifični simptomi. Kod akutnog mastitisa dolazi do mršavljenja i šepavosti, a može doći i do iznenadne smrti te je pojavnost akutnog mastitisa 6,60%, dok se kod kroničnog mastitisa javljaju noduli, intramamarni apscesi te dolazi do atrofije, bez pogoršanja općeg zdravlja. Kronični mastitis se obično otkriva tijekom pregleda ovaca prije pripusta.

Smith i sur. (2015) su provodili istraživanje bakterijskih vrsta povezanih s akutnim i kroničnim mastitisom te su utvrdili da je u 70% uzoraka bio prisutan *S. aureus*, a ova bakterija je prisutna i u naizgled neinficiranoj polovici. Osim *S. aureus* akutni mastitis još mogu uzrokovati *M. haemolytica*, *S. uberis* i *E. coli*. Najčešći uzročnik kroničnog mastitisa je *S. aureus*, dok se mogu izolirati i *Streptococcus* vrste te *A. pyogenes*. Autori su na kraju zaključili da je u istraživanju izolirano 37 bakterijskih vrsta, ali da ne postoji jasna razlika između bakterijskih vrsta povezanih s akutnim i kroničnim mastitisom.

3.5. Sastav i preradbene odlike mlijeka životinja oboljelih od upale mliječne žlijezde

Broj somatskih stanica i, u slučaju ovaca, broj mikroorganizama je bitan parametar zdravlja vimena i životinja. Osim toga, pokazuje i prehrambenu i preradbenu vrijednost mlijeka. Somatske stanice sadrže različite enzime, endogene enzime mlijeka – lipaze, proteaze, oksidaze, glikozidaze, koji katabolički djeluju na mliječne proteine i mliječnu mast te na taj način čine mlijeko nepogodnim za ljudsku prehranu i preradu u sir (Li i sur., 2014).

Zbog povećane permeabilnosti epitela mliječne žlijezde dolazi do povećanog prelaska komponenti iz krvi u mlijeko. Tako se u mlijeku nalazi povećana razina citrata, bikarbonata, te natrijevih iona i iona klora. Iz ovog razloga mlijeko s povećanim brojem somatskih stanica ima veću pH vrijednost. Do ovog zaključka su došli Caballero Villalobos i sur. (2015) te su u svom istraživanju došli do rezultata koji pokazuju da je pH mlijeka s manjim brojem somatskih stanica (562 000/mL) 6,57, dok je pH mlijeka s većim brojem somatskih stanica (1 705 000/mL) povećan na 6,81.

Caballero Villalobos i sur. (2015) također navode da osim povećanja pH vrijednosti mlijeka dolazi i do smanjenja laktoze te ukupne suhe tvari. Do smanjenja laktoze dolazi jer su tijekom upale uništene žljezdane stanice vimena te one gube funkciju i smanjuje se mogućnost stvaranja laktoze, ali i ostalih sastojaka mlijeka (Raynal-Ljutovac i sur., 2007). Udio masti u ovakvom mlijeku se ne mijenja, a udio proteina se ne mijenja ili se povećava. Iako tijekom povećanja broja somatskih stanica ne mora doći do povećanja proteina ipak dolazi do promjene u njihovom sastavu, odnosno mijenja se omjer kazeina i proteina sirutke, čime je veći udio proteina sirutke.

Zbog do sada navedenih promjena u sastavu dolazi i do promjena u preradbenoj sposobnosti mlijeka. Tako je kod mlijeka s povećanim brojem somatskih stanica vrijeme grušanja duže, čvrstoća gruša je manja (Caballero Villalobos i sur., 2015) te dolazi do smanjenja randmana mlijeka zbog smanjenog udjela kazeina, ali i zbog kataboličke aktivnosti enzima.



Slika 3.5.1. Paški sir

Izvor: A. Kostelić

4. MIKROORGANIZMI U OVČJEM MLIJEKU

U bilo kojoj proizvodnji na farmi pa tako i u proizvodnji ovčjeg mlijeka veliki je broj mikroorganizama u okolini pa takvi proizvodi nisu nikada posve čisti. Mikroorganizmi su na farmi sveprisutni pa se tako nalaze na podu i stelji, u zraku, na dlaci i koži životinja gdje su prirodno prisutni. Međutim ovi mikroorganizmi lako mogu dospjeti u vime s poda, preko ruku mužača ili stroja za mužnju ili direktno u mlijeko zbog onečišćenja mlijeka fecesom, dlakom, steljom, prašinom te se brzo razmnožavaju zbog neadekvatnog hlađenja mlijeka. Iz ovog razloga ukupan broj mikroorganizama je glavni indikator higijenske kvalitete ovčjeg mlijeka. Prema Pravilniku o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka NN 27/2017 maksimalan dopušten broj mikroorganizama u ovčjem mlijeku je 1 500 000 cfu/mL. Broj mikroorganizama iznad ove granice ukazuje na lošu higijenu ručne ili strojne mužnje te loše postupanje s mlijekom nakon mužnje. Ovaj broj također može biti indikator mastitisa, odnosno općeg zdravlja stada. Mlijeko s povećanim brojem mikroorganizama nije pogodno za preradu u sir jer se u njemu nalaze enzimi mikroorganizama koji mijenjaju karakteristike određenih sastojaka mlijeka. Ovakvo mlijeko također može sadržavati različite mikroorganizme koji mogu ugroziti zdravlje ljudi. To su najčešće *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Brucella melitensis*, *Mycobacterium spp.*, *Campylobacter jejuni*, *Yerinia enterocolitica* te *S. aureus* (Tonamo i sur., 2020), dok su najčešći mikroorganizmi uzročnici mastitisa *S. aureus* i koagulaza negativni stafilocoki (Tonamo i sur., 2019).

Najčešći uzročnici mastitisa su bakterije, a one se dijele na zarazne i okolišne patogene. U zarazne patogene svrstavaju se *S. aureus*, koagulaza negativni stafilocoki (pr. *S. epidermidis*), streptokoki, dok se u okolišne patogene svrstavaju *E. coli*, *P. aeruginosa*, koagulaza negativni stafilocoki (pr. *S. chromogenes*).

Bakterijski uzročnici mastitisa se također dijele prema jačini upale koju uzrokuju. Tako razlikujemo minor i major patogene (Raynal-Ljutovac i sur., 2007). U minor patogene svrstavaju se koagulaza negativni stafilocoki, *Micrococcus spp.*, *Corynebacterium spp.* Ove bakterije uzrokuju manje povećanje broja somatskih stanica (<200 000/mL). U skupinu major patogena spadaju *S. aureus*, *A. pyogenes*, *S. agalactiae*, *Pasteurella spp.* Major patogeni uzrokuju povećanje broja somatskih stanica za 10 – 100 puta pa tako u mlijeku životinja inficiranih major patogenima može biti i 2 do 3 000 000 somatskih stanica/mL. Gonzalo i sur. (2002) navode da je smanjenje mliječnosti i 8 – 10% ovisno o tome radi li se o infekciji minor ili major patogenima te jesu li zahvaćene obje ili samo jedna polovica.

Mikroorganizmi uzročnici mastitisa u organizam životinje ulaze kroz kožu ili sluznicu, posebno ako su ove prirodne barijere oštećene. Mikroorganizmi ulaze u organizam i na mjestu ulaska se razmnožavaju te proizvode različite enzime i toksine koji uzrokuju propadanje tkiva. Uslijed ovoga dolazi do aktivacije imunskog sustava.

Tonamo i sur. (2020) su radili istraživanje na 4 farme ovaca u Mađarskoj. U tom istraživanju su došli do zaključka da su dvije farme na kojima su držane Lacaune ovce imale slične rezultate ukupnog broja mikroorganizama iako su imale različite uvjete mužnje. Jedna farma je provodila strojnu mužnju i dezinfekciju sisa prije mužnje, a na drugoj se provodila ručna mužnja bez dezinfekcije. Na obje farme utvrđeno je da je ukupan broj mikroorganizama veći od maksimalne dopuštene granice od 1 500 000 cfu/mL (Uredba (EZ) br. 853/2004 Europskog Parlamenta i Vijeća, EZ 2004). Međutim, utvrđeno je da u mlijeku ovaca koje su se muzle strojno nije utvrđena prisutnost bakterije *S. aureus*.

U malih preživača najčešći je subklinički mastitis te je najčešći uzročnik ove upale *S. aureus*. Vasileiou i sur. (2018a) su u svom istraživanju zaključili da je u 70% slučajeva subkliničkog mastitisa uzročnik *Staphylococcus spp.*, najčešće *S. aureus* te koagulaza-negativni stafilocoki. Drugi često izolirani mikroorganizmi uzročnici mastitisa su bili *Streptococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *E. coli*, *Micrococcus spp.*, *M. haemolytica* i *Trueperella pyogenes*.

4.1. *Staphylococcus spp.*

Najčešći uzročnici mastitisa su bakterije iz roda *Staphylococcus*. Stafilocoki su Gram – pozitivni mikroorganizmi, a prema tome stvaraju li enzim koagulazu ili ne, dijele se na koagulaza-pozitivne (*S. aureus*) i koagulaza-negativne stafilocoke. Za izoliranje stafilocoka najčešće je za analizu potrebno uzeti uzorke od individualnih ovaca ili iz skupnog uzorka mlijeka. Na agaru ovčje krvi stafilocoki stvaraju glatke kolonije, niskog konveksnog profila, okruglih rubova, najčešće bijele boje.

Stafilocoki su izrazito patogene bakterije zbog velikog broja virulentnih faktora. Prijanjaju za tkivo domaćina, mogu izbjegavati, nadjačati ili napasti imunosni sustav domaćina te stvaraju štetne enzime ili toksine. Zbog enzima i toksina na mjestu ulaska bakterije u organizam uzrokuju oštećenje tkiva i apscese, a kasnije se šire na druga mjesta u organizmu i oštećenja postaju jača. Različitim proteinima i teikoičnom kiselinom bakterije se pričvršćuju za stanicu i sluznicu domaćina, dok različiti polisaharidi na staničnoj stijenci bakterije inhibiraju fagocitozu.

Izvor infekcije stafilokokima su ruke mužača, sisajuća janjad, stafilocoki prisutni u sisnom kanalu te stafilocoki s kože vimena. Nakon što stafilocoki iz sisnog kanala uđu u parenhim dolazi do aktivacije leukocita koji su glavna linija obrane organizma. Uslijed toga dolazi do povećanja promjera krvnih žila te većeg protoka krvi kroz vime čime dolazi do povećane propusnosti barijere između krvi i mlijeka. Na ovaj način se uspostavlja i pojačava obrambeni mehanizam tijekom čega neutrofili fagocitiraju bakterije. Ako obrambeni mehanizam nije dovoljno jak, dolazi do uništavanja epitelnih stanica i leukocita te se uništavaju krvne žile i dolazi do krvarenja. Međutim, stafilocoki mogu biti prisutni u vimenu bez povećanja broja somatskih stanica odnosno bez da uzrokuju upalu, a jedan od mogućih razloga je taj što su stafilocoki prirodna mikroflora u sisnom kanalu.

Stafilokoki također mogu biti ozbiljna prijetnja za ljudsko zdravlje jer stvaraju egzotoksine koji uzrokuju trovanje hranom i sindrom toksičnog šoka.

4.1.1. *Staphylococcus aureus*

Najčešći uzročnik mastitisa, ujedno i uzročnik koji stvara najveće štete je *S. aureus*. On je primarni uzročnik mastitisa u ovaca te je izoliran u 70% slučajeva kliničkog mastitisa. Ovaj stafilokok stvara leukotoksine koji uništavaju polimorfonuklearne leukocite te monocite domaćina. Osim ove činjenice, može se reći da je *S. aureus* veliki problem u mliječnom stočarstvu jer stvara sluzave egzopolisaharide koji djeluju kao zaštita protiv imunskog sustava domaćina i različitih antibiotika.

Kako bi se smanjila učestalost infekcije sa *S. aureus* bakterijom potrebno je pravovremeno izlučivati zaražene životinje iz uzgoja te provoditi pravilnu higijenu mužnje, a poželjno je i provoditi tretman antibioticima u suhostaju. Također postoji i cjepivo protiv ove vrste uzročnika, ali ono nije pokazalo veliku učinkovitost pa se preporuča koristiti smo u stadima s učestalom pojavom infekcije uzrokovane *S. aureus*.



Slika 4.1.1.1. *S. aureus* na krvnom agaru (lijevo) i uvećan pod mikroskopom (desno)

Izvori: https://www.researchgate.net/figure/Growth-of-Staphylococcus-aureus-after-24-hours-on-blood-agar-and-aerobic-incubation-at_fig1_276557567, <https://pixnio.com/hr/znanost/mikroskopske-slike/staphylococcus-aureus/visoke-uvecanje-10000-x-deformacije-staphylococcus-aureus-bakterije>

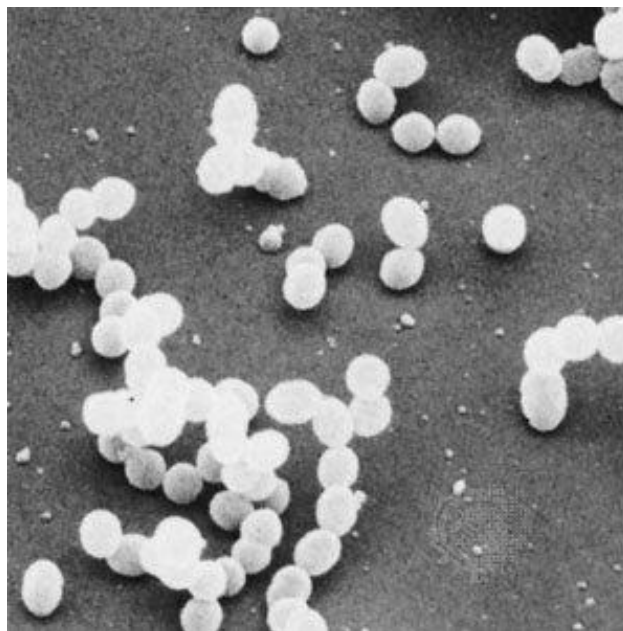
4.1.2. Koagulaza-negativni stafilocoki

Druga najčešća vrsta mikroorganizama uzročnika mastitisa su koagulaza-negativni stafilocoki koji u najvećem broju uzrokuju subklinički mastitis. Oni također mogu uzrokovati i veliko povećanje broja somatskih stanica pa i dovesti do blage kliničke manifestacije upale. Koagulaza-negativni stafilocoki su prirodni stanovnici kože i smatraju se oportunističkim mikroorganizmima. Smatraju se minor patogenima, za razliku od *S. aureus* te drugih streptokoka i koliforma koji su major patogeni. U ovu skupinu spada velik broj vrsta koje se razlikuju prema patogenosti, ali ih se uglavnom tretira kao skupinu, a ne pojedinačno. Vasileiou i sur. (2019) navode da su najčešće izolirani koagulaza-negativni stafilocoki *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. stimulans* i *S. xylosus*. Kod subkliničkog oblika izoliran je i *S. aureus*, ali u manjoj mjeri. Kod infekcije vimena koagulaza-negativnim stafilocokima dolazi do povećanja broja somatskih stanica unutar jednog dana, ali već nakon 2 dana se taj broj smanjuje i vraća u normalne granice. Uslijed ove infekcije može doći do jake lokalne upale te dolazi do jačeg oštećenja parenhima vimena. Koagulaza-negativni stafilocoki su osjetljivi na antibiotik novobiocin, a s obzirom da se ne zna koliko dugo i u kojim količinama ostaje u mlijeku, potrebno ga je koristiti u suhostaju. Postoje određena istraživanja (Paape i sur., 2001) koja navode da je učestalost spontanog izlječenja mastitisa kod malih preživača 20-60%.

Kao preventivne mjere nastanku mastitisa uzrokovanog *S. aureus* i koagulaza-negativnim stafilocokima izrazito je bitna higijena mužnje, a ako se provodi strojna mužnja i higijena i ispravan rad stroja za mužnju. Također je poznato da dezinfekcija sisa nakon mužnje smanjuje rizik od upale uzrokovane s obje vrste bakterija. Korištenje antibiotika u suhostaju doprinosi prevenciji nastanka mastitisa, ali ovim postupkom se također vrši i liječenje već postojeće infekcije bez opasnosti od rezidua antibiotika u mlijeku. Postoje brojna istraživanja koja dokazuju povoljan utjecaj antibiotske terapije u suhostaju na smanjenje rizika nastanka mastitisa. Tako Gonzalo i sur. (2004) navode da je kod upotrebe antibiotske terapije učestalost mastitisa tijekom laktacije smanjena s 40 – 60% na 10 – 25%.

4.2. *Streptococcus* spp.

Streptococcus vrste su bakterije koje spadaju u porodicu *Streptococcaceae* (<https://www.britannica.com/science/Streptococcus>). To su okrugle bakterije koje uglavnom stvaraju lance, Gram pozitivne su i nepokretne.



Slika 4.2.1. *Streptococcus* spp.

Izvor: <https://www.britannica.com/science/Streptococcus>

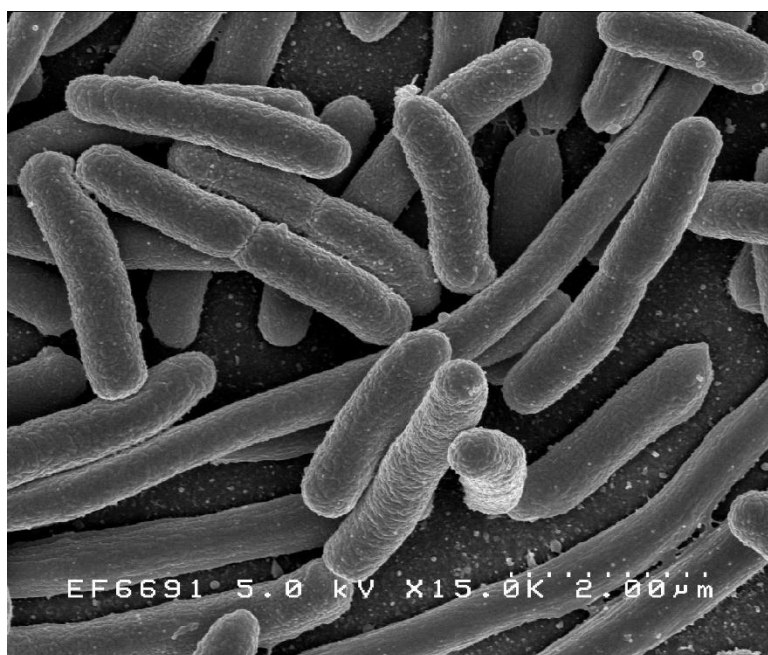
Streptococcus vrste možemo podijeliti u zarazne i okolišne patogene (Bradley, 2002). Vrste koje su dio normalne mikroflore životinja su zarazni patogeni. Oni su prilagođeni suživotu sa životinjom te tijekom infekcije uzrokuju porast broja somatskih stanica bez pojave drugih simptoma upale, odnosno uzrokuju subklinički oblik upale. U ovu vrstu ubrajaju se *S. dysgalactiae* i *S. agalactiae*. Okolišni patogeni nisu dio prirodne mikroflore domaćina, odnosno oni su oportunistički mikroorganizmi. Za razliku od zaraznih patogena koji uglavnom uzrokuju samo povećanje broja somatskih stanica, okolišni patogeni uzrokuju jači odgovor imunskog sustava te vidljive znakove upale. U zarazne patogene još se ubraja *S. aureus*, a okolišne *E. coli*. Međutim, ova podjela, odnosno razlika nije uvijek jasna.

U svom osvrtu na mastitis goveda kao bolest koja se sve više pojavljuje, Bradley (2002) navodi da su u stadima Ujedinjenog Kraljevstva u zadnjih 40 godina najčešći uzročnici mastitisa *E. coli*, *S. aureus*, ali i *Streptococcus* vrste, a to su *S. uberis*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*.

4.3. *Escherichia coli*

E. coli je štapičasta, Gram – negativna bakterija koja se pokreće flagelama. Ona je normalno prisutna u debelom crijevu ljudi i životinja – koliformna bakterija. Ondje je bezopasna, odnosno korisna bakterija jer pomaže u probavi hrane (<https://javnozdravlje.hr/e-coli-infekcije/>).

Ako ova bakterija dospije u bilo koji drugi sustav može uzrokovati ozbiljne posljedice po zdravlje domaćina. Ako *E. coli* uđe u vime ondje brzo uzrokuje upalu vimena, ali i pogoršanje općeg zdravlja životinje. Hirvonen i sur. (1999) te Fogsgaard i sur. (2012) su provodili eksperimente u kojima su vime životinja inficirali određenom dozom *E. coli* bakterije. Hirvonen i sur. (1999) su istraživali akutni odgovor organizma na infekciju vimena *E. coli* bakterijom te su došli do zaključka da su se prvi simptomi počeli pojavljivati već 12 sati nakon infekcije, a životinje su imale srednje do jake znakove bolesti, kako lokalne tako i opće. Fogsgaard i sur. (2012) su istraživali utjecaj bolesti na ponašanje životinja. Nakon infekcije vimena *E. coli* bakterijom prve promjene ponašanja počeli su primjećivati nakon 24 sata. Životinje su manje jele i preživale, prestale su se čistiti te su manje vremena ležale. Prvi znakovi bolesti počeli su se pojavljivati nedugo zatim. Životinje su imale povišenu rektalnu temperaturu, smanjila se mliječnost te se povećao broj somatskih stanica u mlijeku.



Slika 4.3.1. *Escherichia coli* pod mikroskopom

Izvor: <https://www.nationalgeographic.org/encyclopedia/escherichia-coli-e-coli/>

5. MATERIJALI I METODE

Istraživanje se provodilo u 10 stada paških ovaca od veljače do kraja svibnja 2021. godine. U stadima se mužnja provodi ručno. Za analizu se uzimao skupni uzorak mlijeka iz svakog stada u sterilnu posudu. Analiza uzoraka se provodila u Hrvatskom veterinarskom institutu u Zagrebu u Laboratoriju za mastitise i kakvoću sirovog mlijeka, Odjel za bakteriologiju i parazitologiju. U mlijeku se utvrđivao ukupan broj mikroorganizama i somatskih stanica, a također se provodila i determinacija patogenih bakterija, odnosno mikroorganizama uzročnika mastitisa.

5.1. Mikrobiološka pretraga

Mikrobiološka pretraga je provedena na način da je količina od 0,01mL uzorka naciepljena na površinu Petrijeve zdjelice s hranjivom podlogom eskulin-krvni agar pomoću mikrobiološke ušice. Inkubacija se provodila na 37°C kroz 24 sata te su se brojale kolonije bakterija, a uzete su u obzir i morfološke (oblik, veličina i struktura kolonija) i fiziološke osobine (stvaranje pigmenta, izazivanje CAMP fenomena, razgradnja eskulina, sposobnost grušanja plazme kunića, bojanje po Grammu) (National mastitis council, 1999).

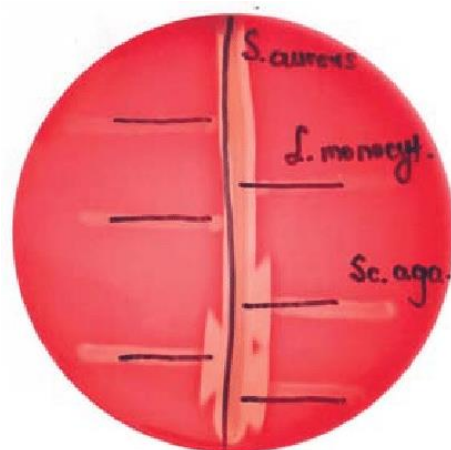
5.2. Identifikacija streptokoka

Bakterije koje su morfološki odgovarale **streptokokima** podvrgnute su CAMP testu. CAMP test se radi na način da se na hranjivu podlogu eskulin-krvni agar u obliku pruge cijelim promjerom Petrijeve zdjelice naciepe β – hemolitički sojevi bakterija. Izdvojeni sojevi streptokoka naciepe se na prethodnu prugu okomito u dužini 6 – 12mm (National mastitis council, 1999). Slijedi inkubacija pri 37°C kroz 24 sata te se radi prosudba porasta bakterija i determinacija streptokoka prema dolje navedenoj tablici.

Tablica 5.2.1. Prikaz prosudbe CAMP testa

BOJA KOLONIJA NA EK/CAMP AGARU	HEMOLIZA	POLUMJESEČASTA HEMOLIZA	BAKTERIJA
plavičasta	+ ili -	+	<i>S. agalactiae</i>
plavičasta	+ ili -	-	<i>S. dysgalactiae</i>
zelenkasta ili smeđa		+	<i>S. uberis</i>
zelenkasta ili smeđa		-	Skupina D po Lancefieldovoj

Izvor: National mastitis council (1999)



CAMP:

S. aureus

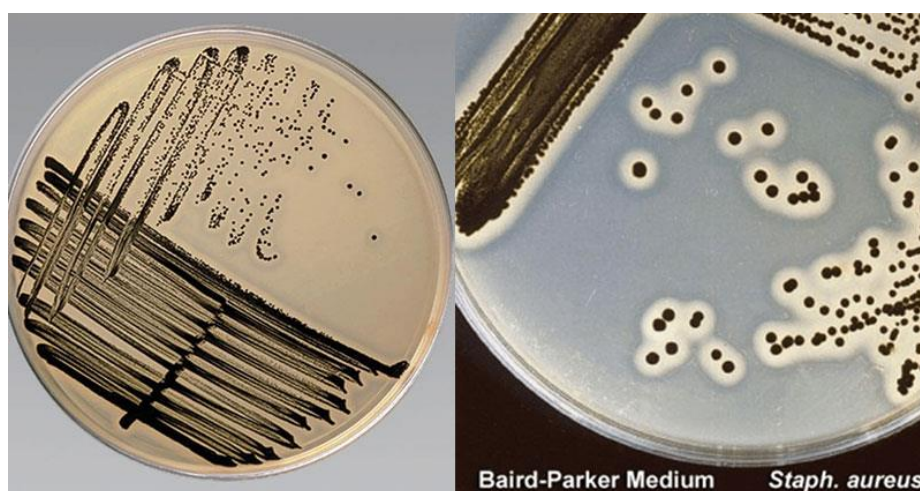
- *L. monocytogenes*
- *Sc. agalactiae*

Slika 5.2.1. Pozitivan CAMP test

Izvor: https://www.researchgate.net/figure/Positive-CAMP-test-L-monocytogenes-and-Staphylococcus-aureus-vertical-Listeriolysin_fig2_47740304

5.3. Identifikacija stafilokoka

Bakterije koje su morfološki odgovarale **stafilokokima** su se naciepljivale na Baird Parker agar te je izvršena inkubacija na 37°C kroz 24 sata. Nakon toga provjeravale su se morfološke (sposobnost rasta te veličina i oblik kolonija) i fiziološke (boja kolonija, prozirnost podloge oko kolonija) osobine rasta stafilokoka te sposobnost tvorbe koagulaze. Za ispitivanje tvorbe koagulaze korištena je sterilna plazma kunića. U 0,5mL plazme suspendirala se puna mikrobiološka ušica poraslih kolonija te se grušenje provjeravalo nakon 4 i 24 sata inkubiranja pri 37°C. Sojevi koji stvaraju žućkasti pigment i izazivaju grušenje su *S. aureus*, a oni koji ne stvaraju koagulazu, odnosno ne izazivaju grušenje su koagulaza-negativni stafilokoki (National mastitis council, 1999).



Slika 5.3.1. Baird-Parker agar sa *S. aureus*

Izvor: <https://microbenotes.com/baird-parker-agar/>

5.4. Identifikacija Gram – negativnih bakterija

Bakterije koje su morfološki odgovarale **Gram-negativnim** uzročnicima mastitisa naciepljene su na podlogu s trostrukim šećerom (Triple Sugar Iron-TSI) i na McConkey agar te su inkubirane na 37°C kroz 24 sata. Nakon inkubacije provodila se prosudba poraslih kolonija. Na TSI agaru promatrana je boja dna, boja kosine i prisutnost plina, a na McConkey agaru sposobnost rasta, boja i izgled kolonija (National mastitis council, 1999).

5.5. Određivanje broja somatskih stanica

Broj somatskih stanica određivan je Fossomatic uređajem, a uzorci su prethodno zagrijani na 37°C. Ovim uređajem se mogu bojati somatske stanice u svježim ili konzerviranim uzorcima mlijeka. U uređaju se jezgre somatskih stanica bojaju etidij-bromid bojom koja oboji DNA. Uzorak zatim prolazi kroz pipetu malog promjer, a pri izlazu iz pipete i uslijed izloženosti zrakama infracrvene svjetlosti jezgre fluoresciraju. Svjetlosni impulsi bilježe se u uređaju, a rezultat je prikazan na ekranu i ispisan na pisaču (Interna skripta, 2019).

5.6. Statistička obrada podataka

Nakon provedenog istraživanja i analiza kojima je određen broj mikroorganizama i broj somatskih stanica u mlijeku paške ovce provedena je statistička obrada podataka u programu SAS (SAS 9.4.). U programu je izračunat prosjek stada te je objašnjena razlika između prosjeka različitih stada i prosjeka pojedinog stada kroz različite mjesece.

6. REZULTATI I RASPRAVA

Nakon četveromjesečnog istraživanja dobiveni su sljedeći rezultati prikazani u tablicama 6.1. i 6.2. Tablica 6.1. prikazuje broj somatskih stanica, a tablica 6.2. mikroorganizama u skupnom uzorku 10 različitih stada kroz 4 mjeseca, od veljače do svibnja 2021. godine.

Iz tablice 6.1. i grafa 6.1. je vidljivo da je 50% uzoraka s brojem somatskih stanica ispod 500 000/mL. Slično navode i Tančin i sur. (2017) te Kastelić i Kavčić (1994) koji navode da je broj somatskih stanica u ovčjem mlijeku manji od 400 000, odnosno 500 000/mL. Barkema i sur. (1998) navode da je taj broj bio i manji od 150 000/mL. Međutim, u ovom istraživanju je broj somatskih stanica ispod ove brojke imalo samo dva stada, stado broj 6 i 9 u ožujku. Bendelja Ljoljić i sur. (2018) su radili istraživanje varijacija kakvoće mlijeka mediteranskih ovaca te su dobili da je broj somatskih stanica u mlijeku paške ovce 209 000/mL. U ovom istraživanju manje od ove vrijednosti broja somatskih stanica su imala samo 3 stada, stado broj 5 u veljači, stado broj 6 i 9 u ožujku. Obzirom na veliki udio uzoraka s malim brojem somatskih stanica (< 500 000/mL) može se zaključiti da životinje nisu bolovala od mastitisa. Međutim, niti kod uzoraka s većim brojem somatskih stanica (500 000 – 1 000 000SS/mL) ne može se sa sigurnošću govoriti o mastitisu jer ovce imaju fiziološki veći broj somatskih stanica.

Tablica 6.1. Broj somatskih stanica u skupnom uzorku od veljače do svibnja 2021.
(BSS=broj somatskih stanica)

SOMATSKE STANICE BSS/mL				
	MJESEC			
STADO	VELJAČA	OŽUJAK	TRAVANJ	SVIBANJ
1	813 000	461 000	563 000	273 000
2	418 000	2 009 000	229 000	775 000
3	331 000	893 000	573 000	261 000
4	427 000	478 000	832 000	711 000
5	190 000	394 000	1 019 000	
6	395 000	131 000	488 000	
7	614 000	440 000	1 172 000	
8	693 000	815 000	1 320 000	
9	478 000	122 000	218 000	
10	550 000	1 288 000	1 017 000	



Graf 6.1. Udio uzoraka podijeljeni u 3 kategorije broja somatskih stanica (broj somatskih stanica/mL, n=34)

Tablica 6.2. prikazuje broj mikroorganizama u mlijeku 10 stada paške ovce. Iz nje, kao i iz grafa 6.2. je vidljivo da je 68% uzoraka imalo broj mikroorganizama iznad 1 000 000/mL. U svom istraživanju Consentino i Palmas (1997) su zaključili da je taj broj u sirovom mlijeku ovaca između 63 000 i 316 000 000 cfu/mL. Ostali uzorci obuhvaćeni ovim istraživanjem su imali do 430 000cfu/mL, dok je samo jedno stado, broj 10 u ožujku imalo broj mikroorganizama ispod 63 000/mL. Potrebno je naglasiti da je prema Uredbi (EZ) br. 853/2004 Europskog Parlamenta i Vijeća (EZ 2004) dopušteni broj mikroorganizama u ovčjem mlijeku 1 500 000/mL.

Tablica 6.2. Broj mikroorganizama u skupnom uzorku od veljače do svibnja 2021.

MIKROORGANIZMI cfu/mL				
	MJESEC			
STADO	VELJAČA	OŽUJAK	TRAVANJ	SVIBANJ
1	>1 000 000	98 000	>1 000 000	>1 000 000
2	174 000	>1 000 000	>1 000 000	>1 000 000
3	140 000	96 000	>1 000 000	>1 000 000
4	430 000	70 000	>1 000 000	>1 000 000
5	199 000	>1 000 000	>1 000 000	
6	120 000	>1 000 000	>1 000 000	
7	>1 000 000	91 000	>1 000 000	
8	>1 000 000	>1 000 000	>1 000 000	
9	>1 000 000	>1 000 000	300 000	
10	>1 000 000	59 000	>1 000 000	



Graf 6.2. Udio uzoraka podijeljeni u 2 kategorije broja mikroorganizama (broj mikroorganizama cfu/mL, n=34)

Osim određivanja broja mikroorganizama i somatskih stanica, u uzorcima se još radila i determinacija patogenih mikroorganizama, odnosno uzročnika mastitisa. Utvrđeno je da su mikroorganizmi koji su se u najvećem broju nalazili u mlijeku paške ovce *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* te *Escherichia coli*.

Kao što je već prije navedeno u radu, *Staphylococcus* vrste su prirodno prisutna mikroflora u sisnom kanalu. Pa tako Vasileiou i sur. (2018b) navode da se ova vrsta mikroorganizama može naći u vimenu ovaca bez uzrokovanja upale, odnosno bez povećanja broja somatskih stanica, te su došli do zaključka da se ovo događa u 6,50% slučajeva u ovaca. Stafilocoki u ovakvom stanju egzistiraju u vimenu sve dok ne dođe do pogodnih čimbenika za njihovu aktivaciju, odnosno dok ne dođe do pada imuniteta domaćina uslijed različitih stresora. Uslijed pada imuniteta dolazi do ozbiljnih posljedica za vime ovaca. U ovu vrstu mikroorganizama spada i *S. aureus* koji je najčešći uzročnik mastitisa među mliječnim životinjama. *S. aureus* najčešće uzrokuje klinički oblik mastitisa, dok koagulaza – negativni stafilocoki uglavnom uzrokuju subklinički oblik upale. Do sličnih rezultata su došli i Mørk i sur. (2007) koji su istraživali klinički mastitis ovaca u Norveškoj te su zaključili da je u 65% slučajeva uzročnik ovog oblika mastitisa *S. aureus*. Ovi autori također navode da je uslijed infekcije ovim mikroorganizmom polovica ili cijelo vime ovaca trajno oštećeno, odnosno gubi funkciju. Opći znakovi bolesti se također mogu pojaviti na životinji, a u ozbiljnijim slučajevima dolazi do gangrene vimena i smrti životinje.

Streptococcus vrste su još jedne od najčešćih vrsta mikroorganizama u ovčjem mlijeku, a također su ozbiljni uzročnici mastitisa. Smith i sur. (2015) navode *Streptococcus* vrste kao česte mikroorganizme u ovčjem mlijeku, odnosno vrste koje uzrokuju mastitis, a Mørk i sur. (2007) također navode i *Streptococcus uberis* kao istaknutiju vrstu koja uzrokuje upalu.

E. coli je česti uzročnik mastitisa mliječnih životinja. Pa tako u svom istraživanju kliničkog mastitisa, Mørk i sur. (2007) također navode da je osim *Staphylococcus* i *Streptococcus* vrsta, jedan od najčešćih uzročnika ovog oblika mastitisa *E. coli*. Ovi autori također navode da je *E. coli* bila prisutna u 6% ovaca koje su imale gangrenu vimena. Smith i sur. (2015) također navode *E. coli* kao čestog uzročnika akutnog mastitisa. Ova bakterija se svrstava u koliformne mikroorganizme, a ako se nađe u vimenu životinja uzrokuje ozbiljne vidljive posljedice na vime i proizvodnju mlijeka životinje. Obzirom da su životinje čije je mlijeko bilo uzeto za uzorak mlijeka naizgled zdrave, odnosno ne pokazuju znakove mastitisa, a somatske stanice u većini uzoraka nisu ekstremno povišene, može se zaključiti da je uzrok prisustva ove bakterije isključivo naknadna kontaminacija mlijeka koliformnim bakterijama iz izmeta. Isto se može zaključiti i ako se uspoređuju somatske stanice i broj mikroorganizama u uzorcima. Kao što je već spomenuto, somatske stanice nisu ekstremno visoke, a u 68% uzoraka je broj mikroorganizama veći od 1 000 000/mL.

Sve do sada navedeno upućuje na to da su životinje u dobrom zdravstvenom stanju, odnosno broj somatskih stanica u većini uzoraka nije veći od 500 000/mL, ali povećan broj mikroorganizama i mikroorganizmi koji su detektirani u uzorcima mlijeka upućuju na naknadnu kontaminaciju mlijeka prljavštinom, posebno izmetom.



Slika 6.1. Zaprljanje mlijeka prljavštinom

Izvor: A. Kostelić



Slika 6.2. Gaza nakon procjeđivanja mlijeka

Izvor: A. Kostelić

7. ZAKLJUČAK

Istraživanjem higijenske kvalitete sirovog mlijeka paške ovce može se zaključiti:

1. Paška ovca je jedna od najpoznatijih pasmina domaćih životinja u Hrvatskoj koja se uzgaja ekstenzivno na pregonim pašnjacima, a mužnja je u većini slučajeva ručna.
2. Tijekom mužnje u kante s mlijekom dopijeva velika količina prljavštine (prašina, trava, dlake, izmet) koja na sebi nosi različite mikroorganizme koji narušavaju higijensku kvalitetu mlijeka te mogu biti ozbiljna prijetnja za zdravlje životinja, ali i ljudi. Tijekom mužnje životinja ne postoji nikakva priprema vimena u smislu pranja ili dezinfekcije, a jedina priprema koju mužači vrše je izmuzivanje prvih mlazova mlijeka.
3. Higijenska kvaliteta mlijeka ovaca može se procijeniti određivanjem broja somatskih stanica te, s obzirom da ovce imaju fiziološki veći broj somatskih stanica, određivanjem broja mikroorganizama u mlijeku.
4. U ovom istraživanju utvrđeno je da je u 50% uzoraka broj somatskih stanica u mlijeku bio manji od 500 000/mL, a 32% uzoraka je imalo između 500 000 i 1 000 000 somatskih stanica/mL.
5. Broj mikroorganizama je u 68% slučajeva bio veći od 1 000 000cfu/mL.
6. Visoki broj mikroorganizmi u mlijeku, te mikroorganizmi koji su detektirani u mlijeku – *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, a posebno *E. coli*, mogu upućivati na upalu mliječne žlijezde životinja, ali mali broj somatskih stanica te dobro zdravlje životinja nisu pokazali postojanost nikakve upale.
7. Iz do sada navedenog se može zaključiti da je velik broj mikroorganizama najvećim dijelom posljedica naknadne kontaminacije mlijeka mikroorganizmima.
8. Čovjek ima najveću ulogu u higijeni mlijeka jer svojim upravljanjem stadom i postupcima tijekom mužnje određuje zdravlje stada i higijenu gotovog proizvoda te zbog toga mora voditi računa o općim higijenskim načelima mužnje, odnosno mora provoditi pravilnu pripremu vimena koja uključuje pranje i brisanje vimena, dezinfekciju prije i nakon mužnje te izmuzivanje prvih mlazova mlijeka.
9. Jedna od korisnih uzgojnih metoda u mliječnom ovčarstvu, pogotovo kod ručne mužnje je i kupiranje repova, čime manje prljavštine dopijeva u kante s repa. Na kraju vlastita higijena mužača je od velike važnosti jer tijekom manipulacije ovcama na vime može prenijeti različite mikroorganizme iz okoline, ali i s ovce na ovcu i tako prenijeti uzročnike upale i različitih zaraznih bolesti.
10. Samo se pravilnom higijenom i uzgojem životinja te redovitim pregledom stada može dobiti mlijeko koje je higijenski ispravno i pogodno za preradu te koje nije prijetnja javnom zdravlju.

8. LITERATURA

1. Albenzio, L. Figliola, M. Caroprese, R. Marino, A. Sevi, A. Santillo (2019): Somatic cell count in sheep milk; *Small Ruminant Research* 176 24–30
2. Albenzio, M., Caroprese, M. (2011): Differential leucocyte count for ewe milk with low and high somatic cell count; *Journal of Dairy Research* (2011) 78 43–48
3. Barać, Z., Mioč, B., Havranek, J., Samaržija, D. (2008): Paška ovca hrvatska izvorna pasmina; Grad Novalja, Matica hrvatska Novalja, Novalja
4. Barkema, H.W., Schukken, Y.H., Lam, T.J.G.M., Beiboer, M.L., Benedictus, G., Brand, A. (1998): Management practices associated with low, medium and high somatic cell counts in bulk milk; *Journal of Dairy Science*, Vol. 81, 7 1917–1927
5. Bencini, R., Atzori, A. S., Nudda, A., Battacaone, G., Pulina, G. (2010): Improving the quality and safety of sheep milk; https://www.academia.edu/17265741/Improving_the_quality_and_safety_of_sheep_milk; PRISTUPLJENO: 25.5.2021.
6. Bendelja Ljoljić, D. i sur. (2018): Sezonske varijacije proizvodnje i kakvoće mlijeka mediteranskih ovaca u ekstremno toplim vremenskih uvjetima; *Journal of Central European Agriculture* 19 (3) p. 629-647 doi: /10.5513/JCEA01/19.3.2178
7. Boutinaud, M., Jammes, H. (2002): Potential uses of milk epithelial cells: a review. *Reprod. Nutr. Dev.* 42, 133–147
8. Bradley, A.J. (2002): Bovine mastitis: an evolving disease; *The Veterinary Journal* 2002, 164, 116±128, doi:10.1053/tvjl.2002.0724
9. Caballero Villalobos, J., Garzón Sigler, A.I., Oliete, B., Arias Sánchez, R., Jiménez, L., Núñez Sánchez, N., Martínez Marín, A.L. (2015): Relationship of somatic cell count and composition and coagulation properties of ewe's milk; *Mljekarstvo* 65 (2), 138-143
10. Contreras, A. J. C. i sur. (1997): Persistence of caprine intramammary pathogens throughout lactation; *J. Dairy Sci.* 80:2815-2819
11. Cosentino, S., Palmas, F. (1997): Hygienic conditions and microbial contamination in six ewe's-milk-processing plants in Sardinia, Italy; *Journal of Food Protection*, Vol. 60, No.3, p. 283-287
12. Čačić, Z., Kalit, S., Antunac, N., Čačić, M. (2003): Somatske stanice i čimbenici koji utječu na njihov broj u mlijeku, *Mljekarstvo* 53 (1) 23-36
13. Fogsgaard, K.K., Røntved, C.M., Sørensen, P. , Herskin, M.S. (2012): Sickness behavior in dairy cows during *Escherichia coli* mastitis; *J. Dairy Sci.* 95: 630–638, doi: 10.3168/jds.2011-4350
14. Godišnje izvješće 2009 – 2019, Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu, <https://www.hapih.hr/wp-content/uploads/2020/10/06-Ovcarstvo-i-kozarstvo.pdf>; PRISTUPLJENO: 07.04.2021.
15. Godišnje izvješće 2009 – 2019, Hrvatska poljoprivredna agencija, <https://hpa.mps.hr/publikacije-godisnja-izvjesca/> PRISTUPLJENO: 08.04.2021.

16. Gonzalez-Rodriguez MC, Gonzalo C, San Primitivo F, Carmenes P (1995): Relationship between somatic cell count and intramammary infection of the half udder in dairy ewes; *J Dairy Sci* 78:2753–2759
17. Gonzalo, C. i sur. (2002): Mammary pathogens and their relationship to somatic cell count and milk yield losses in dairy ewes; *J. Dairy Sci.* 85:1460-1467
18. Gonzalo, C. i sur. (2004): Effects of selective and complete dry therapy on prevalence of intramammary infection and on milk yield in the subsequent lactation in dairy ewes; *J. Dairy Res.* 71, 33-38
19. Hadžiosmanović, M., Kozačinski, L. (2004): Higijenska ispravnost mlijeka Zakon o hrani - veterinarsko-sanitarni nadzor; *Stočarstvo*, Vol.58, No.1 37-45
20. Havranek, J., RupiĆ, V., (2003): Mlijeko – od farme do mljekare; Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb
21. Hirvonen, J., Eklund, K., Teppo, A.M., Huszenicza, G., Kulcsar, M., Saloniemi, H., Pyörälä, S. (1999): Acute phase response in dairy cows with experimentally induced *Escherichia coli* mastitis; *Acta Vet. Scand.*, 40, 35-46
22. <https://javno-zdravlje.hr/e-coli-infekcije/> PRISTUPLJENO: 03.09.2021.
23. Interna skripta, 2019
24. Kastelic, D., Kavčić, S. (1994): Veza između morfologije vimena, mliječnosti i strojne mužnje ovaca; *Mljekarstvo* 44 (2) 105-117
25. Leitner, G., Rovai, M., Merin, U. (2019): Clinical and subclinical intramammary infection caused by coagulase negative staphylococci negatively affect milk yield and its quality in dairy sheep; *Small Ruminant Research* , <http://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2019.07.012>
26. Li, N., Richoux, R., Boutinaud, M., Martin, P., & Gagnaire, V. (2014): Role of somatic cells on dairy processes and products: a review; *Dairy Science & Technology*, 94(6), 517–538
27. Marco, J.C. (1994): Mastitis en la oveja Latxa: Epidemiologia, diagnostico y control, Doktorska disertacija, Sveučilište Zaragoza, Španjolska
28. Martí-De Olives, A., Peris, C., Molina, M. P. (2020): Effect of subclinical mastitis on the yield and cheese-making properties of ewe's milk; *Small Ruminant Research* 184 (2020) 106044
29. Mikuš, M. (1983): študium zmien rozmerov vemena oviec pri strojovom dojení; *Vedecke prace – Vyskumneho ustavu ovčarskeho v Tančine* 11, 165-175
30. Mioč, B., Pavić, V., Sušić, V., (2007): Ovčarstvo; Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb
31. Mørk, T., Waage, S., Tollersrud, T., Kvitle, B., Sviland, S. (2007): Clinical mastitis in ewes; bacteriology, epidemiology and clinical features; *Acta Veterinaria Scandinavica* 2007, 49:23
32. National mastitis council (1999): *Laboratory handbook on bovine mastitis*
33. Paape, M.J.; Poutrel, B., Contreras, A., Marco, J.C., Capuco, A.V. (2001): Milk Somatic Cells and Lactation in Small Ruminants; *J. Dairy Sci.* 84(E. Suppl.):E237-E244

34. Pandek, K., Mioč, B. i sur. (2005): Mliječnost nekih pasmina ovaca u Hrvatskoj; *Mljekarstvo* 55 (1) -14
35. Pavić, V., Mioč, B. i sur. (2005): Vanjština paške ovce; *Stočarstvo* 59:2005 (2) 83-90
36. Pourlis, A. (2019): Ovine mammary morphology and associations with milk production, milkability and animal selection; *Small Ruminant Research*, <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2019.10.010>
37. Pravilnik o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka NN 27/2017
38. Pyorala, S., Taponen, S. (2008): Coagulase-negative staphylococci-Emerging mastitis pathogens; *Veterinary Microbiology* 134 (2009) 3-8
39. Raynal Ljutovac, K. i sur. (2007): Somatic cells of goat and sheep milk: Analytical, sanitary, productive and technological aspects; *Small Ruminant Research* 68, 126-144
40. Romero, G. i sur. (2020): Effects of machine milking on udder health in dairy ewes; *Small Ruminant Research* 188, 106096
41. Rupiće, V. (2010): *Zaštita zdravlja domaćih životinja 3: Fiziologija i patologija reprodukcije*; prof. dr. sc. Vlatko Rupiće, Zagreb
42. Sagi, R., Morag, M. (1974): Udder conformation, milk fractionation in dairy ewe; *Annales de Zootechnie* 23, 185-192
43. Sevi, A. M., Albenzio, R., Marino, A., Santillo, A., Muscio, A. (2004): Effects of lambing season and stage of lactation on ewe milk quality; *Small Ruminant Research* 51, 251-259
44. Sevi, A., Albenzio, M., Taibi, L., Dantone, D., Massa, S., Annicchiarico, G. (1999): Changes of somatic cell count through lactation and their effects on nutritional renneting and bacteriological characteristics on ewe's milk; *Adv. Food Sci.* 21, 122–127
45. Smith, E.M., Willis, Z.N. i sur. (2015): Bacterial species and their associations with acute and chronic mastitis in suckler ewes; *J. Dairy Sci.* 98:7025-7033
46. Tančin, V., Baranovič, S., Uhrinčat, M., Mačuhová, L., Vrškova, M., Oravcová, M. (2017): Somatic cell counts in raw ewes' milk in dairy practice: frequency of distribution and possible effect on milk yield and composition; *Mljekarstvo* 67 (4), 253-260
47. Tonamo, A., Komlosi, I., Peles, F. (2019): Bacteria in milk of sheep with or without mastitis – mini Review; *Acta Agraria Debreceniensis* 2019-1 <http://doi.org/10.34101/actaagrar/1/2369>
48. Tonamo, A., Komlosi, I., Varga, L., Czegledi, L., Peles, F. (2020): Bacteriological Quality of Raw Ovine Milk from Different Sheep Farms; *Animals* 2020, 10, 1163, [doi:10.3390/ani10071163](https://doi.org/10.3390/ani10071163)
49. Uredba (EZ) br. 853/2004 Euroskog Parlamenta i Vijeća (EZ 2004)
50. Vasileiou N.G.C., Chatzopoulos D.C., Sarrou S., Fragkou I.A., Katsafadou A.I., Mavrogianni V.S., Petinaki E., Fthenakis G.C. (2019): Role of staphylococci in mastitis in sheep; *Journal of Dairy Research* 86, 254–266

51. Vasileiou, N. G. C., Cripps, P. J., i sur. (2018a): Extensive countrywide field investigation of subclinical mastitis in sheep in Greece; Journal of Dairy Science, 101(8), 7297–7310
52. Vasileiou, N.G.C., Gougoulis, D.A., Riggio, V., Ioannidi, K.S., Chatzopoulos Mavrogianni, V.S., Petinaki, E., Fthenakis, G.C. (2018b): Association of subclinical mastitis prevalence with sheep breeds in Greece; J. Dairy Res In press
53. Vrdoljak, J. i sur. (2020): Udder morphology, milk production and udder health in small ruminants; Mljekarstvo 70 (2), 75-84
54. www.britannica.com, PRISTUPLJENO: 03.09.2021.

ŽIVOTOPIS

Barbara Reponj rođena je 19.02.1996. u Požegi gdje je pohađala osnovnu školu. Završila je srednju Poljoprivredno – prehrambenu školu u Požegi, smjer Veterinarski tehničar. Godine 2016. upisuje Agronomski fakultet u Zagrebu, preddiplomski studij Animalne znanosti. Nakon završetka preddiplomskog studija 2019. godine na istom fakultetu upisuje diplomski studij Proizvodnja i prerada mlijeka. Tijekom srednje škole praksu je pohađala u veterinarskoj stanici Požega, a stručnu praksu na fakultetu je odrađivala na 2 farme muznih krava. Posjeduje dobre računalne vještine, znanje Microsoft Office paketa (Word, PowerPoint, Excel). Služi se engleskim jezikom u govoru i pisanju (B2 razina).