

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

**UBIKVITARNI POVZROČITELJI VNETJA MLEČNE
ŽLEZE PRI MOLZNICAH**

**ENVIROMENTAL PATHOGENS IN THE MAMMARY
GLAND INFECTION OF DAIRY COWS**

Jernej Gačnikar, Andrej Javornik

Ljubljana, 2020

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

UDK 579.62:618.19-002:615.281.9:616-078:636.2(043.2)

**UBIKVITARNI POVZROČITELJI VNETJA MLEČNE ŽLEZE
PRI MOLZNICAH**

**ENVIROMENTAL PATHOGENS IN THE MAMMARY GLAND
INFECTION OF DAIRY COWS**

Jernej Gačnikar, Andrej Javornik

Delo je pripravljeno v skladu s Pravilnikom o podeljevanju Prešernovih nagrad študentom, pod mentorstvom prof. dr. Andreja Pengova, dr. vet. med., na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani.

Ljubljana, 2020

POVZETEK

Mastitis je najpogostejša in najdražja proizvodna bolezen pri molznicah, ki je razširjena po vsem svetu. Namen naše raziskovalne naloge je bil ugotoviti pogostnost z okoljskimi mikroorganizmi povzročeni subkliničnih mastitisov v slovenskih rejah. Predvsem smo se osredotočili na družini *Streptococcaceae* in *Enterococcaceae* ter morebitno odpornost tovrstnih bakterij na antimikrobne pripravke, ki se uporabljajo pri zdravljenju mastitisa v Sloveniji.

Z bakteriološko analizo smo pregledali 1799 vzorcev mleka iz klinično zdravih vimenskih četrti pri kravah. Od tega je bilo 991 vzorcev odvzetih v hlevih z vezano rejo in 808 vzorcev v hlevih s prosto rejo. V vezani reji smo odkrili povzročitelje subkliničnega mastitisa v 114 vzorcih, od tega v 61 primerih okužbo z okoljskimi povzročitelji. V prosti reji smo odkrili povzročitelje subkliničnega mastitisa v 107 vzorcih, od tega smo v 73 vzorcih dokazali okoljske povzročitelje. Pri rezultatih se med vezano in prosto rejo pojavljajo statistično značilne razlike med povzročitelji mastitisa, pri čemer se več kužnih mastitisov pojavlja v vezani reji (60,92 %), več okoljskih pa v prosti reji (54,48 %).

Med okoljskimi povzročitelji se v vezani reji najpogosteje pojavljajo okužbe z bakterijami vrste *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* in *Enterococcus* sp. in v prosti reji okužbe z vrstami *Streptococcus uberis*, *Enterococcus* sp. in *Lactococcus lactis*.

V vezanih rejah smo v 53 vzorcih dokazali kužne povzročitelje mastitisa, v prostih rejah pa v 34 vzorcih. Med kužnimi povzročitelji subkliničnega mastitisa v naši raziskavi prevladuje vrsta *Staphylococcus aureus*.

Ugotovili smo, da je povprečno število somatskih celic v mleku povezano tudi z velikostjo črede. Povprečno število somatskih celic je bilo nižje v večjih rejah krav molznic v primerjavi z manjšimi čredami.

Amoksicilin s klavulansko kislino je pri vseh preiskovanih sevih zavrl rast bakterijske kulture. Penicilin G, ki je pogosto uporabljen antibiotik v Sloveniji, je bil učinkovit v 78 %. Zelo dobre rezultate smo dosegli tudi s Cefkvinom, ki je uspešno deloval na 87 % bakterijskih sevov.

Ključne besede: mastitis, bovini – mikrobiologija; bakterijske infekcije – mikrobiologija; enterokoki – izolacija in čiščenje; laktokoki – izolacija in čiščenje; streptokoki – izolacija in čiščenje; mleko – mikrobiologija; štetje celic; govedo

SUMMARY

Mastitis is the most common and the most expensive productive disease of the dairy cows all around the world. The aim of the present study was to determine the prevalence of environmental pathogens in Slovenian herds of dairy cows which cause subclinical udder infection. We focused on two family of pathogens *Streptococcaceae* and *Enterococcaceae*. In addition, we researched the optional antibiotic resistance of bacteria used for treatment of udder infection in Slovenia.

A total of 1799 milk samples taken from the clinical healthy udder quarters were studied. 991 samples were taken in tie stall system and 808 samples in free stalls. We found the causative agents of subclinical mastitis in 114 tie stall samples, of which 61 samples contained environmental pathogens. In free stalls, the causative agents of subclinical mastitis were found in 107 samples, of which 73 samples contained environmental pathogens. Statistical analysis of the results indicates that there is a difference between mastitis causes depending on the stall system. More contagious causes (60.92 %) were founded in tie stall system and more environmental causes (54.48 %) were found in free stalls.

Streptococcus uberis, *Streptococcus dysgalactiae* and *Enterococcus sp.* were the most common pathogens among the environmental pathogens in tie stall system, however *Streptococcus uberis*, *Enterococcus sp.* in *Lactococcus lactis* were the most common environmental bacteria in free stalls. In 53 tie stall samples and 34 free stall samples we detected infectious mastitis agents. Among the contagious causes is the most common *Staphylococcus aureus*.

Through the research we found out that the fluctuation in somatic cell count was related with herd size. The average number of somatic cells was lower in larger herds compared to smaller herds.

All target strains of bacteria were sensitive to Amoxicillin with clavulanic acid. Penicillin G and Cefquinome are frequently used for udder infection treatment in Slovenia. Majority of the strains were sensitive to both antibiotics (Penicillin G 78% and Cefquinome 87%).

Key Words: mastitis, bovine – microbiology; bacterial infections; *Enterococcus* – isolation and purification; *Lactococcus* – isolation and purification; *Streptococcus* – isolation and purification; milk – microbiology; cell count; cattle

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	2
SUMMARY	3
KAZALO VSEBINE	4
KAZALO TABEL	6
KAZALO SLIK	8
SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV	10
1 UVOD	12
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	12
1.2 CILJI RAZISKOVANJA	14
1.3 RAZISKOVALNA VPRAŠANJA	14
2 PREGLED LITERATURE	15
2.1 ANATOMSKA ZGRADBA MLEČNE ŽLEZE PRI KRAVAH	15
2.2 OBLIKE MASTITISA	15
2.3 NASTANEK IN POTEK VNETJA MLEČNE ŽLEZE	16
2.4 VRSTE POVZROČITELJEV	16
2.5 OBRAMBNI MEHANIZMI MLEČNE ŽLEZE	19
2.6 SOMATSKE CELICE	22
2.7 DIAGNOSTIKA VIMENSKIH OBOLENJ	23
2.7.1 Aglutinacijski test	24
2.7.2 Katalazni test	24
2.7.3 Koagulazni test	25
2.7.4 MALDI TOF	25
2.7.5 Občutljivost na antibiotike	26
2.8 REJE MOLZNIC V SLOVENIJI IN NA CELJSKEM	26
3 MATERIAL IN METODE DE LA	29
3.1 ŽIVALI	29
3.2 JEMANJE VZORCEV	30
3.3 SHRANJEVANJE IN TRANSPORT VZORCEV	30
3.4 MIKROBIOLOŠKA PREISKAVA	30
3.5 ŠTETJE SOMATSKIH CELIC V MLEKU	31
3.6 PREGLED PLOŠČ	31
3.7 AGLUTINACIJSKI TEST	31
3.8 KATALAZNI TEST	31

3.9	KOAGULAZNI TEST	32
3.10	MALDI-TOF	32
3.11	PREIZKUS OBČUTLJIVOSTI NA PROTIMIKROBNA ZDRAVILA	32
3.12	ANALIZA REZULTATOV MLEČNIH KONTROL	32
3.13	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	33
4	REZULTATI	34
4.1	POGOSTNOST POVZROČITELJEV MASTITISA V VEZANIH REJAH	37
4.2	POGOSTNOST POVZROČITELJEV MASTITISA V PROSTIH REJAH	39
4.3	PRIMERJAVA REJ	41
4.4	ANTIBIOGRAM	42
4.5	POVPREČNO ŠTEVILO SOMATSKIH CELIC	45
5	RAZPRAVA	46
6	SKLEPI	49
7	ZAHVALA	50
8	LITERATURA	51

KAZALO TABEL

Tabela 1 Prirojena obramba mlečne žleze (Vir: Sordillo, 2018);	
Table 1 Innate defence mechanism of mammary gland (Source: Sordillo, 2018)	19
Tabela 2 Definicija mastitisa po priporočilu IDF (Vir: Barnum in Newbouldt, 1961);	
Table 2 Definition of mastitis recommended by IDF (Source: Barnum in Newbouldt, 1961)	23
Tabela 3 Kmetijska gospodarstva, ki redijo govedo, Slovenija 2018 (Jenko in sod., 2019);	
Table 3 Cattle farms, Slovenia 2018 (Jenko in sod., 2019)	27
Tabela 4 Skupine povzročiteljev v vezani in prosti reji;	
Table 4 Groups of pathogens in tied and free range farming	36
Tabela 5 Število subkliničnih primerov mastitisa v vezanih rejah glede na skupino povzročitelja	
Table 5 Number of subclinical cases of mastitis in a tied farm according to the causative group	37
Tabela 6 Okoljske vrste streptokokov subkliničnega mastitisa v vezanih rejah;	
Table 6 Environmental species of streptococci pathogens of subclinical mastitis in a tied farms	38
Tabela 7 Število subkliničnih primerov mastitisa v prostih rejah glede na skupino povzročitelja;	
Table 7 Number of subclinical cases of mastitis in free stall farms according to the causative group	39
Tabela 8 Okoljske vrste streptokokov subkliničnega mastitisa v prostih rejah;	
Table 8 Environmental species of streptococci pathogens of subclinical mastitis in free stall farms	40
Tabela 9 Struktura vzorca glede na obliko reje in vrsto mastitisa;	
Table 9 Sample structure according to the form of breeding and the type of mastitis	41
Tabela 10 Izid χ^2 preizkusa v pojavljanju vrste mastitisa glede na obliko reje;	
Table 10 The result of the χ^2 test in the occurrence of the type of mastitis according to the form of breeding	41
Tabela 11 Občutljivost bakterij Streptococcus spp. na antibiotike;	
Table 11 Streptococcus spp. Bacterial susceptibility to antibiotics	42

Tabela 12 Cone inhibicije rasti bakterij za posamezne antibiotične učinkovine;

Table 12 Bacterial growth inhibition zones for individual antibiotic agents 44

Tabela 13 Povprečno število somatskih celic glede na velikost črede;

Table 13 Average number of somatic cells according to herd size 45

KAZALO SLIK

Slika 1 Delež analiziranih vzorcev mleka po velikostnih razredih ŠSC znotraj let (Jenko in sod., 2019); Figure 1 Proportion of analyzed milk samples by size classes of SCC within years (Jenko in sod., 2019)	27
Slika 2 Zemljevid z označenimi kmetijami, kjer so bili odvzeti vzorci. Zemljevid je v razmerju 1:2 000 000; Figure 2 Map with marked farms where samples were taken. The map is in a ratio of 1: 2,000,000	29
Slika 3 Razmerje med številom vzorcev iz vezane reje in vzorcev iz proste reje; Figure 3 Relationship between the number of samples from tied farming and free range farming	34
Slika 4 Vrsta povzročitelja v preiskovanih vzorcih; Figure 4 Type of causative agent in the sample examined	35
Slika 5 Razmerje med okoljskimi in kužnimi povzročitelji v preiskovanih vzorcih; Figure 5 Relationship between environmental and infectious agents	35
Slika 6 Razmerje med kužnimi in okoljskimi povzročitelji subkliničnega mastitisa v vezanih rejah; Figure 6 Relationship between infectious and environmental pathogens of subclinical mastitis in tied farms	37
Slika 7 Okoljski povzročitelji subkliničnega mastitisa v vezanih rejah; Figure 7 Environmental pathogens of subclinical mastitis in tied farms	38
Slika 8 Razmerje med kužnimi in okoljskimi povzročitelji subkliničnega mastitisa v prostih rejah; Figure 8 Relationship between infectious and environmental pathogens of subclinical mastitis in free stall farms	39
Slika 9 Okoljski povzročitelji subkliničnega mastitisa v prostih rejah; Figure 9 Environmental pathogens of subclinical mastitis in free stall farms	40

Slika 10 Občutljivost bakterij na antibiotike;

Figure 10 Bacterial susceptibility to antibiotics 43

Slika 11 Porazdelitev vrednosti somatskih celic glede na velikost črede;

Figure 11 Distribution of somatic cell values according to herd size 45

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

cm ²	kvadratni centimeter; square centimeter
DNK	deoksiribonukleinska kislina; deoxyribonucleic acid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
Fc	kristalirizirajoče območje fragmenta; fragment crystallizable region
h	ura; hour
H ₂ O	voda, water
H ₂ O ₂	vodikov peroksid; hydrogen peroxide
I	srednje občutljiv, intermediate
IDF	International Dairy Federat
<i>L. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>lat.</i>	latinsko; latin
MALDI-TOF MS	masna spektrometrija; Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight Mass Spectrometry
ml	mililiter; millilitre
mm	milimeter; millimetre
R	odporen; resistant
S	občutljiv, sensitive
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. hyicus</i>	<i>Staphylococcus hyicus</i>
<i>S. pseudintermedius</i>	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
<i>sp.</i>	vrsta; species
<i>spp.</i>	vrste; species
<i>Str. dysgalactiae</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>
<i>Str. parauberis</i>	<i>Streptococcus parauberis</i>
<i>Str. uberis</i>	<i>Streptococcus uberis</i>
ŠSC	število somatskih celic, somatic cell count
t. i.	tako imenovani; so-called

TDTH	T-cell-mediated delayed-type hypersensitivity
TNF	tumorski faktor nekroze; tumor necrosis factor
°C	stopinj celzija, degrees Celsius
μl	mikroliter; microliter

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Mastitis je najpogostejša in najdražja proizvodna bolezen pri molznicah, ki je razširjena po vsem svetu (Persson in sod., 2011).

Vnetje mlečne žleze se običajno kaže s spremembo velikosti prizadete četrti, ki je na otip toplejša, pordela in bolj občutljiva. Poleg sprememb na mlečni žlezi se pojavijo tudi spremembe mleka, v katerem so opazni kosmiči, sprememba barve, mleka je lahko manj in je lahko bolj vodeno. Spremembe so posledica odziva prizadetega tkiva na škodljivo delovanje povzročitelja (Constable in sod., 2017).

Glede na odziv organizma na povzročitelja ločimo subklinični in klinični mastitis. Pri subkliničnem je reakcija tkiva praktično neopazna in takšna okužba pogosto vztraja tudi več mesecev ali skozi celo laktacijo. Na subklinični mastitis praviloma posumimo ob povečanju števila somatskih celic (ŠSC). Pri tem si lahko pomagamo tudi s hitrimi testi (npr. California mastitis test). Klinični mastitis se kaže v obliki spremenjenega mleka (barva, kosmiči) in spremembami na okuženi vimenski četrti (toplota, bolečina, rdečina ...). Zaznamo lahko tudi sistemske znake (Erskine, 2019). Pri kliničnem mastitisu s pregledom vimena ugotovljamo značilne vnetne spremembe, običajno pa so zaznavne tudi spremembe izločka (mleka). Kot že ime pove gre za vnetje mlečne žleze, pri katerem se pojavi oteklina (*lat. tumor*), rdečina (*lat. rubor*), bolečina (*lat. dolor*), povišana telesna temperatura (*lat. calor*) in motnje v delovanju (*lat. functio laesa*). Zmanjša se količina mleka, pojavijo se spremembe na mleku in poveča se število somatskih celic (Persson in sod., 2011).

Dejavniki, ki povečajo možnost nastanka mastitisa, so starost, druga obolenja, pomankanje selena in vitamina E, visoka produkcija, stadij laktacije, slabo upravljanje reje, zdravstveno stanje vimena in seskov. Pri posameznih molznicah je potrebno upoštevati tudi razlike v dovzetnosti, ki so dedne narave. Pomembni dejavniki, ki vplivajo na mastitis, so tudi molzni stroj in postopek molže (Constable in sod., 2017).

Mastitis najpogosteje povzročajo različne vrste streptokokov, stafilokoki in gramsko negativne paličaste bakterije, lahko pa tudi mikoplazme, kvasovke ali plesni. Glede na pot okužbe ločimo kužni ali kontagiozni mastitis in okoljski mastitis. Kužni mastitis, katerega najpogostejši

povzročitelji so *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) in *Streptococcus agalactiae* (*Str. agalactiae*), se najpogosteje širi med molžo preko molznika ali z opremo. Okoljski mastitis običajno povzročajo t. i. drugi streptokoki, stafilokoki in gramsko negativne paličaste bakterije (Erskine, 2019).

Najpogosteje se pojavljajo *Str. uberis*, *Str. dysgalactiae*, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Enterobacter* spp., *Trueperella pyogenes*, *Klebsiela* spp., *Serratia* spp., *Pseudomonas aeruginosa* in drugi mikrobi, ki uspejo preživeti v hlevskem okolju (Vasil, 2009).

Raziskave po svetu dokazujejo, da se okoljski povzročitelji mastitisa pojavljajo v velikem številu in predstavljajo okoli 30 % vseh okužb (Persson in sod., 2011).

Avtorji iz Nizozemske, Anglije in Škotske ugotavljajo, da okoljsko povzročeni mastitis najpogosteje povzroča vrsta *Str. uberis*. O visoki incidenci mastitisov, povzročenih s tem mikrobom, poročajo tudi iz Združenih držav Amerike in Danske. Menijo, da na to najverjetneje vpliva sposobnost mikroba, da hitro razvije rezistenco tako na antibiotike, kot tudi na razkužila (Vasil, 2009).

V obdobju od leta 1997 do leta 2000 je bila v Sloveniji opravljena raziskava vpliva posameznih dejavnikov na uspeh zdravljenja okužb mlečne žleze s *S. aureus*. V raziskavo so bili vključeni tudi ostali povzročitelji, ki so bili ugotovljeni pri bakterioloških preiskavah. V 2139 vimenskih četrtih (47% vseh okužb) je bila ugotovljena okužba z ostalimi povzročitelji: drugi streptokoki, kvasovke, *E. coli* in *Str. agalactiae*. Ugotovljeno je bilo, da sta bili zadnji vimenski četrti pogosteje okuženi. 972-krat sta bili okuženi I (prednja leva četrt) in IV (prednja desna četrt) in 1167-krat II (zadnja leva četrt) in III (zadnja desna četrt). Vzrok naj bi bila slaba higiena vimena in hlevskih površin ter večja možnost poškodb seskov na zadnjih vimenskih četrtih (Čeru in sod., 2000).

S problemom kliničnih in subkliničnih mastitisov se spopadamo že od kar imamo intenzivno proizvodnjo mleka pri kravah molznicah. Z metodami za ugotavljanje subkliničnih mastitisov so se ukvarjali že v poznih petdesetih letih 20. stoletja (Schalm in Noorlander, 1957; Barnum in Newbouldt 1961).

Namen ugotavljanja subkliničnih mastitisov je zmanjšanje ekonomskih izgub v prireji mleka in preprečevanje nadaljnjega razvoja v klinične oblike mastitisov. Prav tako je mleko krav s subkliničnim mastitisom manj kakovostno in tako slabše kakovosti za predelavo. Prav tako pa lahko predstavlja potencialno nevarnost za zdravje ljudi, v kolikor pride do razmnoževanja nevarnih bakterij in do nepravilne konzumacije. (Persson in sod., 2011).

1.2 CILJI RAZISKOVANJA

Glavni cilj naše raziskave je ugotoviti pojavljanje z okoljskimi povzročitelji povzročenih mastitisov v slovenskih rejah, predvsem z bakterijami *Streptococcus* spp., in morebitno odpornost bakterije na antibiotike, ki se uporabljajo pri zdravljenju mastitisov v Sloveniji.

Predvidevamo, da se v slovenskih rejah pojavlja veliko subkliničnih mastitisov, ki pa so s primerno izbiro antibiotika ozdravljivi.

1.3 RAZISKOVALNA VPRAŠANJA

Pri našem delu smo postavili naslednja raziskovalna vprašanja:

- Katera od bakterij povzroča največ okoljsko povzročenih mastitisov v slovenskih rejah?
- Ali obstajajo razlike v pogostnosti obolenj s kužnimi in okoljskimi mastitisi glede na način reje?
- Ali je bakterija *Streptococcus* spp. občutljiva na antibiotike, ki se najpogosteje uporabljajo v Sloveniji?
- Ali obstaja razlika v povprečju števila somatskih celic med velikimi in majhnimi čredami krav molznic?

2 PREGLED LITERATURE

2.1 ANATOMSKA ZGRADBA MLEČNE ŽLEZE PRI KRAVAH

Pri kravah leži mlečna žleza v dimeljskem področju. Prekriva jo koža, ki je trdno povezana s podlago in ne vsebuje znojnic in lojnic. Žlezo na površini obdaja vezivna kapsula. Na trebušno steno je pripeta z elastičnimi vezmi, kar kravi omogoča lažje prenašanje tresljajev med hojo in tekom kljub veliki teži mlečne žleze. Plahtaste vezi se v mlečni žlezi razvejičijo in obdajajo posamezne žlezne režnje.

Parenhim mlečne žleze je sestavljen iz sekrecijskih mešičkov (alveol), mlečnih izvodil, sinusov, vimenske in seskove cisterne. V alveolah, ki so premera 0,1 – 0,25 mm, se sintetizira mleko. Sestavljene so iz epitelnih celic. Iz alveol vodijo mlečni kanalčki, ki se zlivajo v večja izvodila. Mlečni kanali se na posameznih delih razširijo v sinuse. Večji odvodni kanali se zlivajo v mlečno cisterno. Ta se deli na dva dela in sicer na žlezni (parenhimski) in seskov (papilarni) del. Seskov del cisterne se nadaljuje v seskov kanal (*ductus papillaris*), ki ga zapira mišica zapiralka (*sphincter papillae*). Mišica zapiralka je sestavljena iz gladkih mišičnih celic, ki jih podpirajo vzdolžne in krožne sluznične gube. Ob stimulaciji mlečne žleze pred molžo ali sesanjem se gube izravnajo, mišična zapiralka se odpre in tako omogoči iztok mleka. V mlečni žlezi so tudi, bolj ali manj, izražene plasti gladkih mišičnih celic in mioepitelnih celic, ki omogočajo zadrževanje, praznjenje in iztiskanje mleka (Vatovec, 1981).

2.2 OBLIKE MASTITISA

Glede na intenzivnost kliničnih znakov ločimo klinični in subklinični mastitis, glede na čas trajanja ločimo akutni, subakutni in kronični mastitis, glede na razširjenost vnetnega procesa pa kataralni, intersticijski in parenhimatozni mastitis. Pri akutnem vnetju so klinični znaki najbolj izraženi, saj poteka burno. Jasno so izraženi znaki vnetja (*rubor, tumor, dolor, calor in functio laesa*), pogosto je prizadeto tudi splošno zdravstveno stanje živali (povišana temperatura, spremenjen srčni utrip, dihanje in ruminacije), izrazito pa se spremeni tudi izgled mleka. Pri subakutnem mastitisu praviloma splošno zdravstveno stanje živali ni prizadeto, vnetni proces je milejši, spremembe na mleku pa so različno izražene. Kronični mastitis lahko nastane iz akutnega vnetja, ali pa že od začetka poteka v tej obliki. Vnetje je včasih bolj, drugič manj izraženo, mleko pa je v večini primerov blago spremenjeno.

Pri subkliničnem poteku žival ne kaže znakov okužbe, a kljub temu izloča mikrobo in prenaša okužbo na druge živali v čredi (Jurčević in Čeru, 2001).

2.3 NASTANEK IN POTEK VNETJA MLEČNE ŽLEZE

Vnetje mlečne žleze (mastitis) je najpogostejša bolezen vimena. Običajno je vzrok okužba s patogenimi mikroorganizmi, lahko pa je povzročen tudi s fizikalnimi ali kemijskimi agensi. Pot okužbe je lahko hematogena, perkutana ali galaktogena. Najpogosteje je vnos povzročiteljev v mlečno žlezo galaktogen, preko seskovega kanalčka (Schulz, 1994). Zaradi prilagojenosti nekaterih bakterij na hlevsko okolje mastitisa pri kravah ni mogoče povsem izkoreniniti. A sam stik povzročitelja z mlečno žlezo v večini primerov še ni dovolj, saj na razvoj okužbe vpliva še vrsta drugih dejavnikov. Te dejavnike lahko razdelimo na tri sklope in sicer žival, povzročitelj in okolje.

Posamezna žival lahko s svojimi pridobljenimi in prirojenimi obrambnimi mehanizmi prevlada negativne vplive povzročitelja ali okolja in tako vpliva na potek vnetja mlečne žleze. Tudi pri isti živali se odpornost s časom spreminja. Najpogostejši razlogi za razlike v odpornosti so mlečnost (proizvodnja mleka je obratno sorazmerna z odpornostjo živali, kar pomeni, da so boljše molznice tako tudi bolj izpostavljene okužbi), bolezni (npr.: poporodne bolezni, vnetja maternice, motnje v presnovi, bolezni parkljev), starost (s starostjo se slabi moč mišic zapiralk, kar poveča možnost vstopa povzročitelja skozi seskov kanal), oblika vimena (velika, globoka, ohlapna vimena so dovzretnejša za poškodbe in posledično okužbe), bolezni kože vimena (npr.: razjede, ekcemi, bradavice), laktacijsko obdobje (mlečna žleza je najbolj občutljiva v prvih tednih po telitvi, v zadnjih tednih pred presušitvijo in zlasti v prvi polovici presušitvenega obdobja) in prehrana (deficit selena, vitaminov, kalcija).

Med dejavnike okolja uvrščamo pripravo vimena na molžo, potek molže, pravilno delovanje molznega stroja, način reje, podnebne razmere, splošno nego in oskrbo živali (Jurčević in Čeru, 2001).

2.4 VRSTE POVZROČITELJEV

Klinično ali subklinično obliko mastitisa lahko v primerjavi z ostalimi kužnimi boleznimi povzroči veliko število mikroorganizmov. Najpogostejši bakterijski povzročitelji so Gram pozitivni koki (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*) in paličaste Gram negativne

bakterije (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*...). Pojavljajo se tudi okužbe s kvasovkami, plesnimi in mikoplazmami. Te okužbe so lahko zelo nevarne, a se pojavljajo redko (Jurca, 1983).

Med mikroorganizmi, ki so vezani na žival oziroma na mlečno žlezo (kontagiozni povzročitelji) se najpogosteje pojavljata vrsti *Streptococcus agalactiae* in *Staphylococcus aureus*.

Mikroorganizmi, ki za svoj razvoj in razmnoževanje ne potrebujejo gostitelja (ubikvitarni povzročitelji) pa so *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, kvasovke (*Candida albicans*) in plesni (*Aspergillus fumigatus*) (Jurčević in Čeru., 2001).

Streptococcus uberis

Streptococcus uberis sodi med najpogostejše povzročitelje mastitisa pri kravah, saj predstavlja 14–20 % klinično zaznavnih mastitisov. Prvič je bil opisan leta 1932. Z DNK hibridizacijo sta bila določena dva tipa in sicer I in II. Kasneje je bilo ugotovljeno, da sta oba genotipa filogenetsko ločena, zato je bilo predlagano, da se tip II označi kot *Str. parauberis*. Ločevanje je mogoče samo z DNK polimerizacijo.

Streptococcus uberis lahko povzroči mastitis pri telicah, presušeni kravah in kravah v katerikoli laktaciji. Je ubikvitarno prisoten v okolju (Oliver in sod., 2011).

Streptococcus parauberis

Tako kot *Streptococcus uberis* je tudi *Streptococcus parauberis* pogosto vzrok okoljsko povzročenih mastitisov pri kravah. Na podlagi rasti kulture na gojišču kot tudi morfoloških, biokemijskih in seroloških značilnosti vrste ni mogoče razlikovati od *S. uberis* (Oliver in sod., 2011).

Streptococcus dysgalactiae

Str. dysgalactiae je klasificiran kot okoljski, pa tudi kontagiozni povzročitelj mastitisov. V čredi se lahko prenaša ob molži, pogosto pa ga lahko izoliramo tudi iz okolja. Najpogosteje povzroča mastitise v hlevih s slabo higieno ali pri kravah s spremenjenimi oziroma poškodovanimi seski. Povzroča lahko tudi mastitis pri presušeni kravah in telicah (Oliver in sod., 2011).

Lactococcus lactis

Bakterija *Lactococcus lactis* se pogosto uporablja v prehrambeni industriji in zato ni uvrščena med patogene vrste bakterij. A novejša raziskava povezuje vrsto *L. lactis* tudi s pojavljanjem mastitisov pri kravah (Rodrigues in sod., 2016).

L. lactis je bil v preteklosti obravnavan kot streptokokni povzročitelj mastitisa, kamor so laktokoki prvotno tudi spadali. Prvič je bil kot povzročitelj mastitisa opisan pri vodnem bivolu leta 1996, kasnejše raziskave pa so dokazale, da je pomemben povzročitelj mastitisa tudi pri kravah (Rodrigues in sod., 2016).

Aerococcus viridans

Aerococcus viridans je pogosto izoliran kot povzročitelj subkliničnega mastitisa, kljub temu da njegova vloga pri nastanku mastitisa še ni povsem razjasnjena. Spada med okoljske povzročitelje mastitisa (Saishu in sod., 2015).

Enterococcus spp.

So okoljske vrste povzročiteljev, ki jih najdemo v naravi kot tudi v hlevu in silaži. Najpogosteje iz vimena izoliramo vrsti *Enterococcus faecalis* in *E. faecium*. Idealno okolje za razmnoževanje in razvoj predstavljajo nečisti ležalni boksi ali stojišča, kjer pogosto pridejo v stik z vimenom in lahko povzročijo mastitis. Najučinkovitejši preventivni ukrep predstavlja čisto, suho okolje in ustrezen način molže (Čeru in sod., 2000).

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus je po svetu, kot tudi v Sloveniji, najpomembnejši povzročitelj mastitisa pri molznicah. Povzroča 5% do 30% kliničnih in več kot polovico subkliničnih mastitisov. Na krvnem agarju raste v obliki okroglih kolonij rumene, bele ali zlate barve okrog katerih nastane pas popolne (alfa) in nepopolne (beta) hemolize (Varaldo in sod., 1978). Pogosto naseljujejo kožo in sluznice pri ljudeh in živalih. Hitro se lahko prenašajo iz vimena na vime, predvsem s pomočjo molznih enot, rok molznikov in krp za čiščenje vimena (Nelson in sod., 1991; Gregorović, 1988).

Streptococcus agalactiae

Čeprav lahko vrsta *Str. agalactiae* preživi nekaj časa v okolju, spada med izrazito kontagiozne povzročitelje mastitisa. V čredah, kjer ni nadzora nad okužbami mlečne žleze in primernih pogojev reje, povzroča velike izgube. S krave na kravo se prenaša z molžo, brisačami, rokami molznikov in teleti, ki sesajo različne krave. Prenaša se lahko celo s preparati za zdravljenje mastitisa, ki so namenjeni večkratni uporabi. Povzroča mastitise tako pri telicah kot tudi pri kravah (Oliver in sod., 2011).

2.5 OBRAMBNI MEHANIZMI MLEČNE ŽLEZE

Obrambni mehanizem mlečne žleze je sestavljen iz kompleksnega sistema celic, molekul in tkiv, ki pri obrambi sodelujejo. Razdelimo ga lahko na prirojeno in pridobljeno obrambo. Prirojena obramba deluje že v nekaj sekundah, medtem ko je za delovanje pridobljene obrambe potrebnih nekaj dni, da se popolnoma aktivira (Sordillo, 2018).

Prirojena obramba je najpomembnejša, ko se mlečna žleza s povzročiteljem sreča prvič. Povzročitelja lahko popolnoma nevtralizira in tako sploh ne pride do sprememb v mleku ali tkivu mlečne žleze. Sestavljena je iz fizične bariere, ki sodeluje s celičnimi in molekularnimi mehanizmi (Tabela 1) (Sordillo, 2018).

Tabela 1 Prirojena obramba mlečne žleze (Vir: Sordillo, 2018);
Table 1 Innate defence mechanism of mammary gland (Source: Sordillo, 2018)

Faktor	Glavne funkcije
Konica seska	Mišica zapiralka preprečuje vstop mikrobom Keratin z bakteriostatično aktivnostjo Furstenbergova rozeta s populacijo levkocitov (vloga še ni povsem znana)
Vzorčno prepoznavni receptor	Prepoznavanje bakterij in aktivacija vnetnega odziva
Komplement laktoferin	Bakterioliza in lajšanje fagocitoze Preprečitev uporabe železa, ki je potreben za rast bakterij
Citokini	Regulacija prirojene obrambe
Oksilipidi	Regulacija mikrovaskulacije Organizacija vnetnega odziva
Epitelijske celice	Prepoznavna bakterij s pomočjo receptorjev

Endotelijske celice	Nadzor krvnega pretoka do okuženega tkiva Nadzor migracije levkocitov
Nevtrofilci	Fagocitoza
Makrofagi	Fagocitoza Produkcija citokinov in oksilipidov Odstranitev celičnega debrisa
Dendritične celice	Fagocitoza Produkcija citokinov
Celice ubijalke	Prepoznavna okuženih celic Sekrecija antibakterijskih proteinov

V kolikor mikroorganizmom uspe premagati prvo obrambno črto, se v vimenu sproži vrsta specifičnih in nespecifičnih obrambnih mehanizmov. Nespecifične obrambne mehanizme predstavljajo lizocim, proteini akutne faze in posamezne komponente komplementnega sistema ter interferon. Fagociti imajo sposobnost prepoznati tujke, jih vezati na svojo celično steno in vgraditi v vakuolo, obdano s celično membrano. Tako vkljenjen tujek (bakterijo) fagocit s pomočjo toksičnih anorganskih radikalov ubije in prebavi z lizosomalnimi encimi. Fagocitozo bistveno olajša komplementni sistem. Ta je sestavljen iz kompleksnega zaporedja beljakovin, ki se medsebojno aktivirajo in tako sprožijo vnetno reakcijo, povečujejo prepustnost tkiv za proteine iz krvne plazme in včasih celo direktno uničijo bakterijo. Če je mogoče, posamezne zajete delce razgradijo. Pri fagocitozi sodelujeta dve vrsti celic. Prvi pridejo v žarišče vnetnega procesa nevtrofilni granulociti. Ti krožijo po krvi in ob lokalni invaziji mikroorganizmov hitro infiltrirajo tkivo. Imajo sposobnost, da zelo hitro prodrejo iz perifernega krvnega obtoka skozi vrzeli v endotelu žil in migrirajo na mesto okužbe. Pri tem opazamo t. i. vodeno migracijo s pomočjo kemoatraktinov, ki se vežejo na specifične receptorje na plazemski membrani nevtrofilnih granulocitov. Pri govedu je najučinkovitejši kemoatraktin C5a. Ta nastane ob razpadu pete komponente komplementa. Ob aktivaciji nevtrofilnih granulocitov s pomočjo kemoatraktinov se njihova plazemska membrana naguba. Na sprednjem in zadnjem koncu se izoblikujejo podaljški, ki celici omogočajo premikanje. Ob tem se aktivirajo tudi lizosomske granule, ki povečujejo njihovo baktericidno aktivnost. Zaradi vseh teh sprememb lahko ob prihodu na mesto okužbe takoj delujejo kot fagociti. Drugi, ki pridejo na mesto vnetja, so monociti v krvi in makrofagi oziroma

histiociti, ki so prisotni v praktično vseh tkivih. Posebej veliko makrofagov je v jetrih, vranici, pljučih, ledvicah in bezgavkah. Vsi ti organi so dobro prekrvavljeni, zato mikroorganizmi v krvi pridejo v stik z njimi (Tizard 1992).

Prvi pogoj za fagocitozo pa je, da fagocit bakterijo prepozna. Ločimo imunsko in neimunsko prepoznavo. Pri imunski sodelujejo protitelesa in C3b fragmenti. Ti se kot opsonini vežejo na bakterijsko celico. Nevtrofilni granulociti in makrofagi imajo posebne receptorje za Fc del protiteles in C3b fragmente, kar omogoča uspešno fagocitozo. Ne imunsko prepoznavo pa temelji na hidrofobnih lastnostih celične površine. K uspešni fagocitozi prispeva tudi površina, na katero so fagociti vezani. Tako površine prekrte s fibronektinom in lamininom povečajo učinkovitost receptorjev CR1 in CR3 in posledično fagocitozo. K hitrosti fagocitoze posredno ali neposredno prispeva še veliko snovi, kot na primer TNF (tumor necrosis factor). Specifično obrambo predstavljajo limfociti. Ti prepoznajo antigene in z njimi reagirajo. Najdemo jih povsod v telesu. Ob razvoju fetusa potujejo celice iz hematopoetskih organov v razvijajoči se kostni mozeg, kjer prevzamejo vlogo matičnih celic za limfocite in ostale krvne celice. Tako se s stalno delitvijo v kostnem mozgu razvije veliko število celic. Limfociti iz kostnega mozga potujejo v kri in po celem organizmu. Limfociti, ki prispejo do timusa, tu dokončno dozoriijo do limfocitov T. Kasneje preko krvi prispejo do bezgavk in vranice. Na svoji površini imajo receptorje za antigene. Ob njihovi združitvi se celice aktivirajo in pričnejo deliti. Razvrščamo jih v različne podenote. Celice pomagalke pomagajo pri pospeševanju imunskega odziva, medtem ko celice zaviralke zavirajo imunski odziv. Citotoksične celice prepoznajo z virusi okužene celice in jih uničijo. Tako sicer organizem uniči lastno celico, a hkrati prepreči replikacijo virusa. Pri pozni preobčutljivostni reakciji pa sodeluje populacija celic TDTH (T-cell-mediated delayed-type hypersensitivity). Ostali limfociti, ki ne prispejo do timusa, se po dozorevanju v kostnem mozgu naselijo direktno v perifernih limfatičnih organih. Te limfocite imenujemo limfociti B. Njihova naloga je sinteza protiteles. Posamezen limfocit B lahko proizvaja le eno vrsto protiteles, zato mora imeti organizem veliko število različnih limfocitov B. Ko se limfocit B sreča z za njega specifičnim antigenom, se aktivira in prične deliti. Iz več zaporednih delitev nastane klon celic, ki pričnejo proizvajati protitelesa, ki se vežejo na antigen in povzročijo njegovo uničenje. Večina celic po proizvodnji protiteles propade, del pa se jih ohrani. Imenujemo jih spominske celice. Te lahko več let krožijo po krvi in ob ponovnem srečanju z antigenom sprožijo veliko hitrejši in učinkovitejši imunski odziv (Tizard 1992).

Poleg limfocitov pri imunskem odzivu sodelujejo še dendritične celice, bazofilni in eozinofilni granulociti in naravne ubijalke (Čeru in sod., 2000).

2.6 SOMATSKE CELICE

Paape in sodelavci so leta 1963 za celice, ki jih najdemo v mleku, predlagali izraz »milk somatic cells«, ki je bil sprejet v mednarodno terminologijo in ga tako uporablja večina avtorjev. Pomen teh celic v mleku so poznali že zelo zgodaj. Prvo metodo za štetje sta izdelala Stokes in Wegefarth že leta 1897. Približno deset let kasneje je Savage opisal posamezne vrste celic v mleku. Leta 1911 sta Prescott in Breed objavila rezultate preiskav o načinu štetja celic, ki se praktično nespremenjen uporablja še danes. S pomočjo laboratorijske zanke ali pipete na predmetnico naneseemo 0,01 ml mleka in ga razmažemo na površino 1 cm². Takšen razmaz pobarvamo z metilenskim modrilom in s pomočjo mikroskopa preštujemo 100 vidnih polj.

Leta 1957 sta Schalm in Noorlander poročala o razvoju novega testa za ugotavljanje mastitisa, poimenovala sta ga Kalifornija mastitis test, ki je pomenil prelomnico v hitri diagnostiki mastitisa (Schalm in Noorlander, 1957; Barnum in Newbouldt 1961).

Razvila sta reagent, ki povzroči reakcijo ob stiku z deoksiribonukleinsko kislino (DNK). Reagent povzroči razpad celic in sproščanje DNK. V primeru povečanega števila celic v mleku se sprosti večja količina DNK, kar povzroči močnejšo reakcijo. Test omogoča hitro diagnostiko v hlevu (Batis, 1964). Kljub temu, da je ta metoda hitra, saj se pozitivni rezultat pokaže že v nekaj sekundah ob stiku z reagentom, je premalo natančna. Reakcija je pozitivna šele, ko vzorec preseže 500 000 celic na mililiter (Jensen, 1957). Enostavnost in hitrost avtomatskih števecv tipa »Fossomatic« je nadomestila neposredno mikroskopsko ugotavljanje števila somatskih celic. Le-to je omogočilo natančnejše rezultate in zmanjšalo stroške štetja celic v mleku (Jones in sod., 1983).

K somatskim celicam v mleku prištevamo predvsem nevtrofilne granulocite, makrofage in limfocite. Njihova naloga je eliminacija (fagocitoza) povzročiteljev in obnova poškodovanega tkiva. V primeru okužbe te celice iz krvi potujejo na prizadeto mesto (Timms, 1990).

Tabela 2 Definicija mastitisa po priporočilu IDF (Vir: Barnum in Newbouldt, 1961);
Table 2 Definition of mastitis recommended by IDF (Source: Barnum in Newbouldt, 1961)

Diagnoza	Bakteriološka analiza	Število somatskih celic/ml
-----------------	------------------------------	-----------------------------------

Zdrava vimenska četrt	Negativna	< 500000
Motnje v sekreciji	Negativna	>500000
Latentna okužba	Pozitivna	<500000
Mastitis	Pozitivna	>500000

2.7 DIAGNOSTIKA VIMENSKIH OBOLENIJ

Najpogosteje na mastitis posumi lastnik ob molži. Pri pregledu se najprej osredotočimo na ogled (adspekpcijo) in tipanje (palpacijo) vimena in pripadajočih bezgavk. Pri tem ocenjujemo obliko, velikost in barvo vimena, posameznih seskov in seskove papile ter simetrijo vimenskih četrti. Pozorni smo tudi na morebitne poškodbe in izpuščaje po koži vimena in seskov.

Z otipom ugotavljamo oteklino, toploto, bolečino in pomičnost kože, konsistenco cisterne in vimenskega parenhima. Najbolje jo je opraviti po molži, ko je žleza prazna.

Ogledu in tipanju vimena sledi pregled mleka. Spremembe na mleku se pokažejo predvsem zaradi povečane prepustnosti krvnih žil. Prve curke mleka pomolzemo v posodo s temnim dnom, kjer so spremembe na mleku najlažje opazne. Najpogosteje se pojavi sprememba barve, kosmiči, strdki in kri. Ocenimo tudi obliko mlečnega curka. Ob vnetju vimena je pogosto spremenjen vonj mleka. Primerjamo tudi količino mleka po posameznih vimenskih četrtih in odvezamo vzorce mleka za laboratorijske preiskave.

Hitro oceno števila somatskih celic lahko opravimo že v hlevu s pomočjo mastitis reagenta (California mastitis test), a ta v primerjavi z bakteriološkim izidom kaže 9% lažno pozitivnih in 22% lažno negativnih reakcij (Maili in sod., 1987).

Na podlagi klinične slike mlečne žleze in splošnega stanja živali ter preizkusa z mastitis reagentom lahko postavimo diagnozo klinične oblike mastitisa.

Pri subklinični obliki mastitisa kliničnih znakov ni ali pa so slabo izraženi, prav tako splošno stanje živali ni prizadeto. Za postavitev diagnoze tako upoštevamo rezultate citološke preiskave (določanje števila somatskih celic), bakteriološke preiskave (dokaz povzročitelja) in antibiograma. V našem raziskovalnem delu smo uporabljali števec somatskih celic Fossomatic 360, Type 15700, A/S N. FOSS ELECTRIC, ki ne ločuje posameznih levkocitov med sabo, ampak šteje samo skupno število somatskih celic.

Kljub temu, da je eden osnovnih znakov subkliničnega mastitisa povečano število somatskih celic, samo na podlagi števila še ne moremo postaviti zanesljive diagnoze, saj na število, poleg mastitisa, vpliva še veliko drugih dejavnikov (obdobje laktacije, starost krave, pogostost molže, stres ...). Problem predstavljajo tudi lažno negativni rezultati, ko je število somatskih celic kljub prisotnosti povzročitelja nizko (Pengov in Klinkon, 2001).

Za določitev povzročitelja je potrebna bakteriološka preiskava, s katero izoliramo patogene mikroorganizme. Na krvnem agarju s 5% ovčje krvi ob primerni temperaturi zadovoljivo uspevajo vsi mikrobní povzročitelji mastitisa z izjemo mikoplazem (Pengov in sod., 1996). Za vrstno specifično determinacijo se opravljajo nadaljnji testi (aglutinacijski test, katalazni test, koagulacijski test), biokemijske in molekularne preiskave (Quinn in sod., 1994).

2.7.1 Aglutinacijski test

Aglutinacija je ena izmed najstarejših seroloških metod, ki nam omogoča, da brez uporabe mikroskopa dokažemo okužbo z določenimi mikroorganizmi. Poznanih je več metod, ki se med seboj razlikujejo glede uporabe različnih materialov. Tako poznamo avtomatizirane aglutinacijske metode (s pomočjo računalniškega zaznavanja valovnih dolžin), aglutinacijo v različnih gelih, sedimentacijsko aglutinacijo in aglutinacijo na ravnih površinah (steklo, plastični materiali, karton). Aglutinacijski test izvedemo tako, da preiskovanemu vzorcu (serum, mleko...) dodamo specifičen antigen. Če pride do reakcije (kosmičenja), je to dokaz, da so v vzorcu prisotna ustrezna protitelesa in da je organizem (žival, človek) prišel v stik z iskanim povzročiteljem. Pri determinaciji streptokokov se aglutinacijski preizkus uporablja za določanje seroloških skupin (klasifikacija po Lancefield-ovi) (van Oss, 2000).

2.7.2 Katalazni test

Katalazni encim uvrščamo v sklop obrambnih mehanizmov organizma proti oksidativnemu stresu. Omenjeni encim molekulo vodikovega peroksida (H_2O_2) razgradi na vodo (H_2O) in prosti kisik, ki izhaja v obliki plinskih mehurčkov. S testom ugotavljamo prisotnost encima katalaze pri določenih bakterijskih vrstah. Test izvedemo tako, da 3% vodikovem peroksidu primešamo preiskovano bakterijsko kulturo. V primeru, ko se pojavijo mehurčki (kisika), je test pozitiven. Test nam služi za razlikovanje med posameznimi rodovi po Gramu pozitivnih kokov. Katalazno pozitivni so

stafilokoki in mikrokokki, negativni pa streptokoki in enterokoki (Sepasi Tehrani in Moosavi-Movahedi, 2018).

2.7.3 Koagulazni test

Ločevanje med koagulazno negativnimi in koagulazno pozitivnimi vrstami stafilokokov sodi k rutinski diagnostiki mastitisa in ima pomembno vlogo pri izbiri terapije in preventivnih ukrepov (Akineden in sod., 2001). Med koagulazno pozitivnimi vrstami stafilokokov je kot povzročitelj mastitisa najpomembnejši *S. aureus* (Kloos in Schleifer, 1975).

Koagulazni preizkus izvedemo v epruvetah in sicer najprej dolijemo kunčjo plazmo in nato suspendiramo preiskovane kolonije. Epruvete inkubiramo in pregledamo po 4 in 24 urah. V primeru pozitivne reakcije se plazma strdi. Koagulazno pozitivne vrste stafilokokov so *S. aureus*, *S. pseudintermedius* in *S. hyicus* (Kloos in Schleifer, 1975).

2.7.4 MALDI TOF

V zadnjih letih je zlati standard za identifikacijo bakterij in gliv v mikrobiološkem laboratoriju postal MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry) (Schubert in Kostrzewa 2017). Tehnika je bila prvič razvita proti koncu osemdesetih let 20. stoletja. Od takrat se stalno razvija in je prilagojena za uporabo v mikrobioloških laboratorijih.

Preiskovane kolonije prenesemo na za to pripravljeno ploščo in prelijemo z raztopino matriksa. Nato naprava z laserskim žarkom ionizira kompleks bakterija-matriks. Na podlagi mase in električnega naboja peptidov nastane zelo značilen spekter, ki je individualen za vsako bakterijsko vrsto. MALDI-TOF MS se za identifikacijo osredotoča na masni spekter med 2000 in 17000 Daltoni, ki ga primerja z referenčno bazo podatkov, ki vsebuje posamezne spektre bakterijskih in glivičnih vrst (Dierig in sod., 2015).

2.7.5 Občutljivost na antibiotike

Zaradi vse večje odpornosti bakterij na protimikrobna zdravila je potrebno njihovo prodajo in uporabo natančno nadzorovati, da se omogoči ocena tveganja in učinkovitost terapije. V idealnem primeru bi zdravljenje z antibiotiki moralo vedno temeljiti na rezultatih mikrobioloških preiskav in preizkusu na učinkovitost posameznih antibiotikov (antibiogram). Pri zdravljenju je potrebno uporabiti priporočen odmerek zdravila in upoštevati predpisan čas terapije. Pri živalih, katerih proizvodi se uporabljajo za prehrano ljudi, je potrebno upoštevati tudi karenco zdravila.

Test za določitev najprimernejšega antibiotika (antibiogram) se lahko izvede v laboratoriju s kliničnimi izolati bakterij. Za ugotavljanje bakterijske občutljivosti na določen antibiotik se uporablja različne metode. Enostavna in sorazmerno poceni metoda je Kirby – Bauer disk difuzijski test, ki se pogosto uporablja v diagnostičnih laboratorijih (Quinn in sod., 1994).

Je hitra in dovolj zanesljiva metoda za ugotavljanje občutljivosti bakterij na antibiotike. Pomembno je, da uporabljamo čiste bakterijske kulture, saj lahko le tako dobimo točne rezultate. Na petrijevko z Mueller-Hinton agarjem, ki ima premer 90 mm, po vsej površini z mikrobiološko vatenko nanesemo suspenzijo preiskovanih bakterij. Na ploščo nanesemo do 7 komercialno pripravljenih papirnatih antibiotičnih diskov. Plošče inkubiramo 24 ur (do 48 ur za počasi rastoče mikroorganizme) na temperaturi 35°C (Reller in sod., 2009).

2.8 REJE MOLZNIC V SLOVENIJI IN NA CELJSKEM

V Sloveniji je bilo leta 2018 na 30.351 kmetijskih gospodarstvih registriranih 461.973 govedi. Povprečno slovensko gospodarstvo je redilo 15,2 glave govedi in se je, v primerjavi z letom 2017, povečalo za 0,4 glave. Zaradi pritiska po večjem ekonomskem učinku prireje se je pri nas močno povečalo povpraševanje po kravah in telicah mlečnega tipa. Med aktivnimi živalmi so prevladovale krave, ki so zavzemale 34,4 % vse goveje živine, sledijo teleta s 30,6 %, telice z 20,3 % ter biki s 14,7 %.

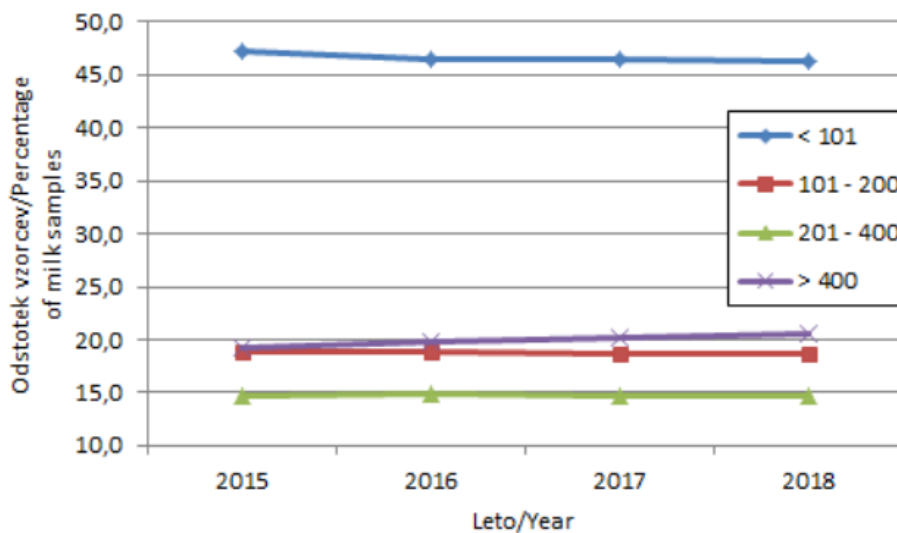
V letu 2018 so na 22.640 kmetijskih gospodarstvih redili 158.863 krav, od tega 97.938 molznic in 60.925 dojlj. Kmetije, ki opuščajo prirejo mleka, se pogosto preusmerjajo v rejo krav dojlj. V kontrolo prireje mleka je bilo ob koncu leta vključenih 3.369 kmetijskih gospodarstev, kjer so redili 79.156 molznic, kar je 80,8 % vseh molznic. Število čred v kontroli prireje mleka se je v primerjavi

z letom 2017 zmanjšalo za 147 kot tudi število molznic (-1149). Povprečna slovenska kmetija s kravami molznicami je redila 17,1 krave (Jenko in sod., 2019).

Tabela 3 Kmetijska gospodarstva, ki redijo govedo, Slovenija 2018 (Jenko in sod., 2019);
Table 3 Cattle farms, Slovenia 2018 (Jenko in sod., 2019)

	Krave molznice			Krave molznice v kontroli			
	Št. kmetij	Št. krav	Št. krav na kmetijo	Št. kmetij	Št. krav	% krav	Št. krav na kmetijo
Enota Celje 2018	1.271	20.471	16,1	693	14.925	73	22
Slovenija 2018	5.732	97.938	17,1	3.369	79.156	81	24

V naši raziskavi je bilo na kmetijah v povprečju 19,96 molznic v laktaciji. Na našem območju (enota Celje) je še vedno veliko kmetij z vezano rejo, ki redijo manj kot deset živali in lastniki večinoma nimajo interesa za preiskave na subklinične mastitise, saj se te kmetije pretežno ne preživljajo od prodaje mleka.



Slika 1 Delež analiziranih vzorcev mleka po velikostnih razredih ŠSC znotraj let (Jenko in sod., 2019);
Figure 1 Proportion of analyzed milk samples by size classes of SCC within years (Jenko in sod., 2019)

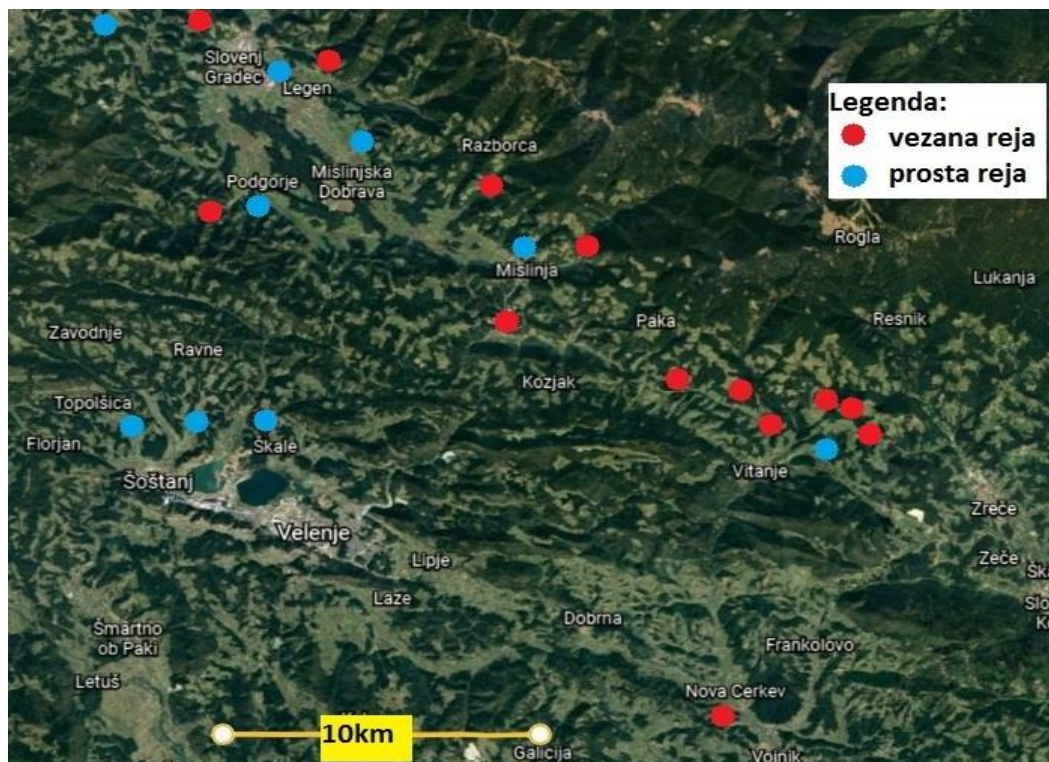
Število somatskih celic (levkocitov) je, kot smo že omenili, eden od osnovnih parametrov za ugotavljanje prisotnosti oziroma razširjenosti subkliničnih vnetij mlečne žleze v čredi. Število celic v skupnem (hlevskem) vzorcu mleka je, poleg ostalega, odvisno tudi od velikosti

črede, kar je prikazano na sliki 1. Črede z manjšim številom krav imajo v hlevskem vzorcu povprečno več somatskih celic kot črede z večjim številom živali. Zelo izrazito je to pri črno beli pasmi, ki ima v primerjavi z ostalimi pasmami najvišje povprečje celic v mleku. Prikaz povprečnega ŠSC po območjih kaže na ugodnejše stanje na ljubljanskem in celjskem področju. Območje celjskega zavoda pokriva mlekarna Celeia, ki se v zadnjih letih zelo trudi v iskanju rešitev za izboljšanje tehnološke kakovosti mleka rejcev, ki oddajajo mleko v njihovo mlekarno in je lahko zgled dobre prakse sodelovanja z rejci in nekaterimi strokovnimi službami (Jenko in sod., 2018). Podobne podatke smo zbrali tudi v naši raziskavi, saj je bilo povprečje števila somatskih celic nižje v večjih rejah krav molznic. Rejci z večjim številom živali (nad 20 molznic) se intenzivneje ukvarjajo s prirajo mleka, zato jim je bolj pomembno število somatskih celic, od katerega je odvisna odkupna cena mleka. Poleg tega je obrat (remont) živali v večjih rejah v povprečju hitrejši, kar pomeni, da je v čredi več prvesnic (krav v prvi laktaciji), pri katerih je prevalenca subkliničnega mastitisa nižja.

3 MATERIAL IN METODE DE LA

3.1 ŽIVALI

V raziskavo je bilo vključenih 458 krav molznic (rjave, črno bele in lisaste pasme), ki smo jih razdelili v dve skupni. V prvi skupini je bilo 250 živali, ki so bile v hlevih s privezom in molžo na stojšču. V drugi skupini je bilo 208 živali, v prosti reji z ležalnimi boksi in molžo v ločenem molzišču (ribja kost ali prehodni tandem). V raziskavi smo se osredotočili na kmetije v naši okolici, ki smo jih izbrali naključno. Vzorčili smo na 14 kmetijah z vezano rejo krav molznic in na 9 kmetijah s prosto rejo. Kot prikazuje slika 2, so kmetije, na katerih smo vzorčili, s področja Savinjske, Šaleške in Mislinjske doline, ter okolice Vitanja, Vojnika in Slovenj Gradca. Ena kmetija je bila iz okolice Mirne Peči na Dolenjskem, na zemljevidu pa zaradi oddaljenosti ni označena. V raziskavo smo vključili krave, ki so bile takrat v laktaciji in niso kazale kliničnih znakov mastitisa.



Slika 2 Zemljevid z označenimi kmetijami, kjer so bili odvzeti vzorci. Zemljevid je v razmerju 1:2 000 000;
Figure 2 Map with marked farms where samples were taken. The map is in a ratio of 1: 2,000,000

3.2 JEMANJE VZORCEV

Vsem živalim smo pred začetkom molže aseptično odvzeli vzorce mleka iz posameznih vimenskih četrti. Krave smo najprej identificirali (ime, ušesna številka) in neponovljivo označili epruvete, da ne bi prišlo do zamenjav. Arabska številka predstavlja številko krave, rimska številka pa vimensko četrt, pri čemer je prednja leva označena s številko I, zadnja leva II, zadnja desna III in prednja desna IV.

Pri kravah, ki so jih molzli na stojišču, smo pristopali s strani, kjer se običajno molze. Če vime ni bilo pretirano umazano, smo ga obrisali s papirnato brisačo za enkratno uporabo. Umazana vimena smo umili z aseptično raztopino in kožo osušili s papirnato brisačo za enkratno uporabo. Vse seske smo razkužili z razredčenim 70 % alkoholom (ETANOL 96 %, DENATURIRAN TIP B, S PHARMACHEM, Sušnik Jožef s. p.). Pri tem smo, v izogib morebitni kontaminaciji, najprej razkužili seske na nasprotni strani vimena. Prve curke mleka smo zavrgli, nato pa približno 10 ml mleka pomolzli v sterilno epruveto, ki smo jo držali pod kotom 65°, da smo preprečili kontaminacijo vzorca iz kože seskov. Vzorce mleka smo jemali v nasprotnem vrstnem redu, kot smo razkuževali seske, torej smo najprej vzeli vzorce iz seskov, ki so nam bili bližje. Skupno smo odvzeli 1799 vzorcev mleka.

3.3 SHRANJEVANJE IN TRANSPORT VZORCEV

Epruvete smo zaprli s sterilnim plutovinastim zamaškom in ohladili na 4 °C. Za tem smo jih v čim krajšem času v hladilni torbi dostavili v laboratorij. Med transportom smo vzdrževali primerno temperaturo, saj se v nasprotnem primeru lahko kontaminanti v mleku namnožijo in ne dobimo pravih rezultatov.

3.4 MIKROBIOLOŠKA PREISKAVA

Epruvete smo v laboratoriju razporedili v stojalo. Vzorce smo z nežnim obračanjem premešali in nato z laboratorijsko zanko odvzeli približno 1 µl mleka in ga enakomerno nanesti na označeno petrijevko s krvnim agarjem. Vzorce smo inkubirali v inkubatorju (Kambič Laboratorijska oprema tip I-115) aerobno pri 37 °C in opazovali rast kolonij po 24 in 48 urah.

3.5 ŠTETJE SOMATSKIH CELIC V MLEKU

Število somatskih celic smo določili s pomočjo avtomatskega števca za štetje celic Fossomatic 360 Type 15700 (A/S N. FOSS ELECTRIC). Mleko iz posameznih četrti smo prelili v za to namenjene čaše, jih postavili na tekoči trak, od koder je naprava samodejno odvezla potrebno količino mleka in določila število somatskih celic v mililitru mleka. S pomočjo števila ugotovljenih somatskih celic smo ločevali okužbo od kontaminacije vzorca.

3.6 PREGLED PLOŠČ

Po 24 in 48 urah smo plošče pregledali in ocenili rast značilnih kolonij. Pri tem smo ocenjevali morfologijo, barvo, velikost, prisotnost hemolize in vonj. Opazovali smo tudi število kolonij in tip rasti (čista, kontaminirana). Kultura na plošči je lahko mikrobiološko negativna, lahko je na njej nekaj patogenih kolonij (enakih ali različnih), ali pa je kontaminirana.

Pri določanju vrste bakterij smo po potrebi opravili tudi katalazni, koagulazni in oksidazni preizkus.

3.7 AGLUTINACIJSKI TEST

Test smo izvedli tako, da smo izbranim kolonijam primešali specifična protitelesa. Če je prišlo do kosmičenja, je bil rezultat pozitiven. Aglutinacijo smo uporabili za določanje seroloških skupin pri streptokokih.

3.8 KATALAZNI TEST

S testom smo ločili stafilokoke od streptokokov. Z njim smo ugotavljali prisotnost encima katalaze, ki razgrajuje vodikov peroksid. Test smo izvedli tako, da smo 3 % vodikovem peroksidu, ki smo ga kanili na predmetno stekelce, dodali kulturo bakterij. Če so se pojavili mehurčki (kisika), je bil test pozitiven. Katalazno pozitivni so stafilokoki, negativni pa streptokoki.

3.9 KOAGULAZNI TEST

Izvedli smo ga tako, da smo v epruvete dali fiziološko raztopino ter kunčjo plazmo. Nato smo v vsebino epruvete suspendirali še kolonijo. Inkubirali smo 24 ur ter pregledali. Če je bila kolonija koagulaza pozitivna, se je vsebina epruvete strdila. Koagulazno pozitivne so patogene vrste stafilokokov.

3.10 MALDI-TOF

Zaradi natančne določitve vrste streptokokov smo kolonije presadili na svež krvni agar in jih pri temperaturi 37 °C inkubirali v inkubatorju (Kambič Laboratorijska oprema tip I-115) 24 ur. Po 24 urah so bile kolonije primerne za analizo z MALDI-TOF.

Vzorec čiste kolonije smo prenesli na za to pripravljeno ploščo, dodali reagent in ploščo z vzorci vstavili v napravo, ki nam je računalniško izpisala vrsto bakterije.

3.11 PREIZKUS OBČUTLJIVOSTI NA PROTIMIKROBNA ZDRAVILA

Pri vseh izolatih iz rodu *Streptococcus* smo opravili preizkus, s katerim smo določili občutljivost bakterij na v Sloveniji pogosteje uporabljena protimikrobna zdravila. Uporabili smo diske, ki so vsebovali penicilin G (OXOID Ltd. UK Penicilin G, 10µg), streptomycin (OXOID Ltd. UK Streptomycin, 10µg), amoksicilin s klavulansko kislino (OXOID Ltd. UK amoksicilin/klavulanska kislina 2:1, 30µg), tetraciklin (OXOID Ltd. UK Tetraciklin, 30µg), kanamicin (OXOID Ltd. UK Kanamicin, 30µg) in cefkvinom (OXOID Ltd. UK Cefkvinom, 30µg).

Uporabili smo krvni agar (5 % ovčja kri), na katerega smo nanegli suspenzijo čiste kulture. Nato smo na površino položili diske posameznih antibiotikov s premerom 6 mm in jih inkubirali v inkubatorju (Kambič Laboratorijska oprema tip I-115) 24 h pri temperaturi 37°C. Po inkubaciji smo s kljunastim merilom izmerili premer cone inhibicije rasti in s pomočjo podatkov iz tabel določili, ali je bakterija na določen antibiotik občutljiva (S, ang. sensitive) ali pa je proti njemu odporna (R, ang. resistant) oziroma zmerno občutljiva (I, ang. intermediate).

3.12 ANALIZA REZULTATOV MLEČNIH KONTROL

Skupno število somatskih celic med preiskovanimi rejami smo primerjali s pomočjo rezultatov mlečnih kontrol. Uporabili smo podatke mlečnih kontrol iz Centralne podatkovne zbirke govedo pri Kmetijskem inštitutu Slovenije. V izogib izrazito visokim ali nizkim temperaturam, ki lahko vplivajo na število somatskih celic v mleku, smo uporabili podatke za september leta 2019. Tri rejce, ki niso v redni mlečni kontroli, smo izločili iz te analize.

3.13 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

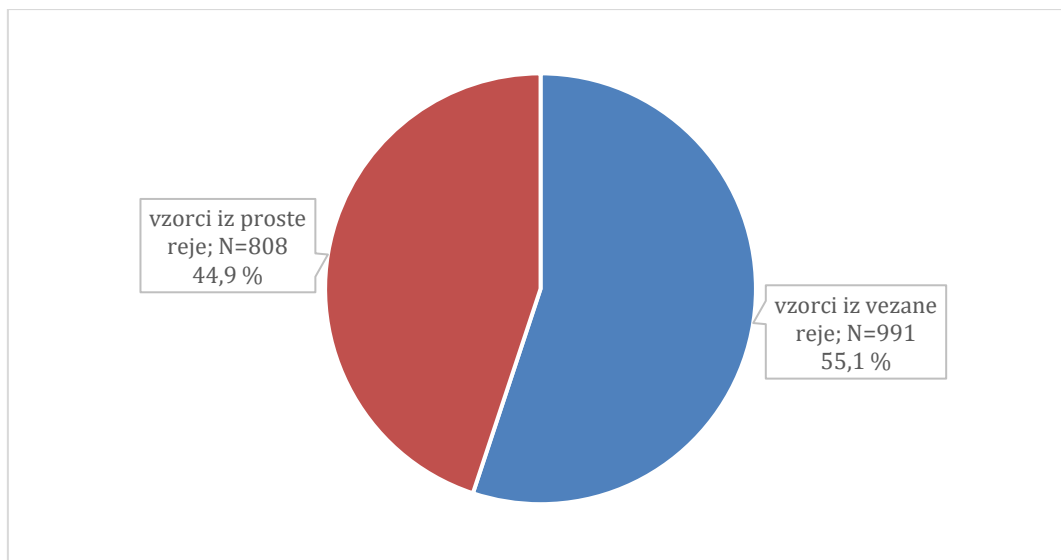
Rezultate smo statistično obdelali z računalniškim programom za statistične analize SPSS (ver. 22). Izračunali smo Pearsonov χ^2 . Ugotovljene povzročitelje smo razdelili v dve skupini in sicer med kužne in okoljske povzročitelje, razlike pa smo iskali posebej v vezanih rejah in posebej v prostih rejah.

Primerjali smo tudi razlike v številu somatskih celic med različno velikimi čredami. Pri številu somatskih celic smo izračunali povprečje, mediano in kvartile glede na velikost črede, ki smo jih razdelili v štiri velikostne razrede (do 10 molznic, 11 do 20 molznic, 21 do 40 molznic, nad 41 molznic).

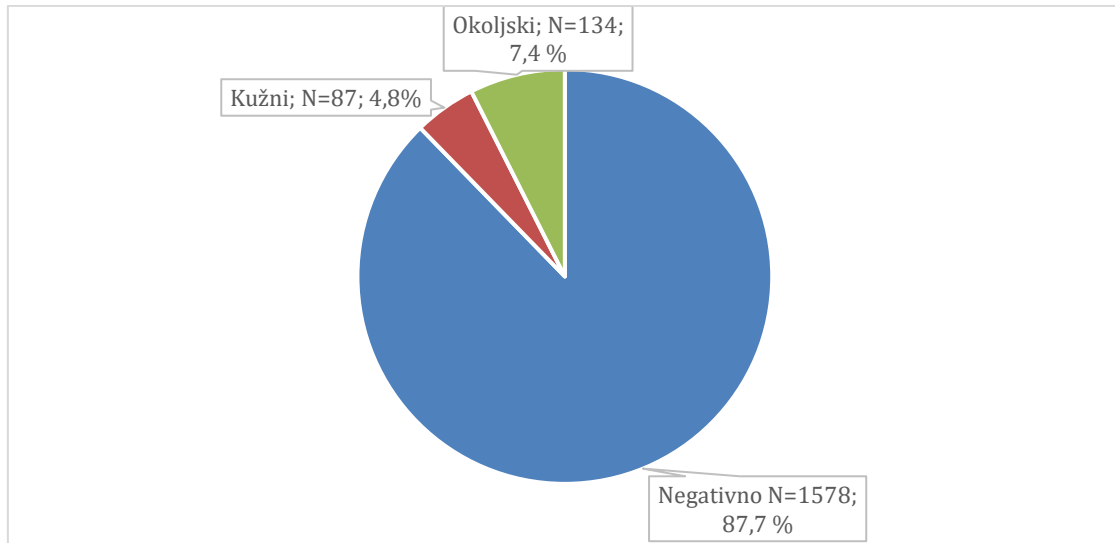
4 REZULTATI

V naši raziskavi smo odvzeli 1799 vzorcev mleka iz posameznih vimenskih četrti. Kakor je razvidno na sliki 3, je bilo 991 vzorcev odvzetih v hlevih z vezano rejo in 808 vzorcev v hlevih s prosto rejo.

Na kmetijah v naši raziskavi je bilo povprečno 19,96 molznic v laktaciji. V hlevih s prosto rejo je bilo povprečno 23,11 molznic v laktaciji (208 živali), odvzeli smo v povprečju 89,78 vzorcev mleka na rejo. V hlevih z vezano rejo je bilo povprečno 17,86 molznic v laktaciji (250 živali), odvzeli smo v povprečju 70,79 vzorcev mleka na rejo. Kljub manjšemu številu kmetij s prosto rejo je bilo število vzorcev primerljivo, saj je povprečno število živali v hlevih s prosto rejo višje.

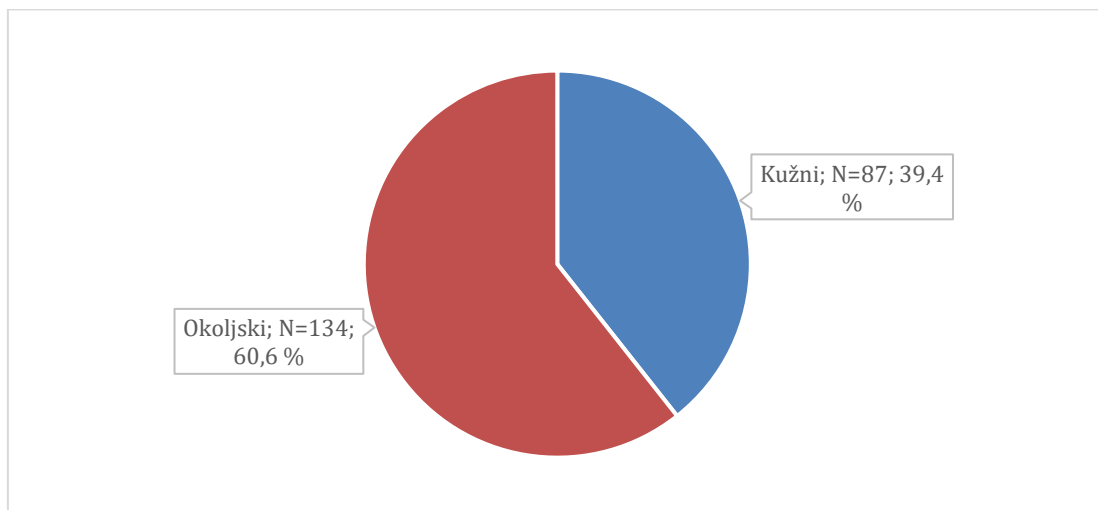


Slika 3 Razmerje med številom vzorcev iz vezane reje in vzorcev iz proste reje;
Figure 3 Relationship between the number of samples from tied farming and free range farming



Slika 4 Vrsta povzročitelja v preiskovanih vzorcih;
Figure 4 Type of causative agent in the sample examined

V vseh primerih (N=1799; 100 %) smo določevali tako kužne kot tudi okoljske povzročitelje mastitisa. Kot je vidno na sliki 4, smo v 87 (4,8 %) primerih dokazali kužne povzročitelje, okoljske pa v 134 (7,4 %) primerih. 1578 (87,7 %) vzorcev je bilo bakteriološko negativnih.



Slika 5 Razmerje med okoljskimi in kužnimi povzročitelji v preiskovanih vzorcih;
Figure 5 Relationship between environmental and infectious agents

Kakor prikazuje slika 5, je bila okužba odkrita v 221 vimenskih četrtih. V 87 (39,4 %) primerih je šlo za kužne povzročitelje mastitisa, za okoljske pa v 134 (60,6 %).

Tabela 4 Skupine povzročiteljev v vezani in prosti reji;
Table 4 Groups of pathogens in tied and free range farming

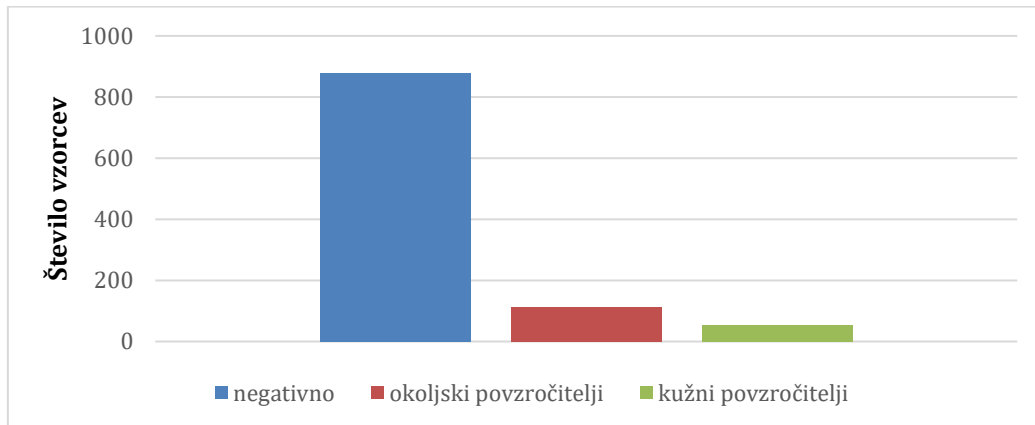
		Vrsta reje				Skupaj
		Vezana reja		Prosta reja		
		Število vzorcev	% znotraj vezane reje	Število vzorcev	% znotraj proste reje	
Skupina mikrobov	Negativno	877	88,5 %	701	86,8 %	1578
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	0	0 %	0	0 %	0
	Drugi streptokoki	61	6,2 %	73	9,0 %	134
	<i>Staphylococcus aureus</i>	41	4,1 %	21	2,6 %	62
	Koagulaza negativni stafilokoki	5	0,5 %	4	0,5 %	9
	Bacilarni povzročitelji	7	0,7 %	9	1,1 %	16
Skupaj		991	100 %	808	100 %	1799

Kakor je razvidno iz tabele 4, je bilo v vezanih rejah 61 primerov mastitisa povzročenega z okoljskimi vrstami streptokokov, 41 primerov z vrsto *Staphylococcus aureus*, v 5 primerih s koagulaza negativnimi stafilokoki in v 7 primerih z bacilarnimi povzročitelji.

V prostih rejah je bilo 73 mastitisov povzročenih z okoljskimi vrstami streptokokov, 21 z vrsto *Staphylococcus aureus*, v 4 primerih s koagulaza negativnimi stafilokoki in v 9 primerih z bacilarnimi povzročitelji.

V vezanih rejah je bilo bakteriološko negativnih 877 (88,5 %) vzorcev in v prostih rejah 701 (86,8 %) vzorec. V nobenem primeru nismo izolirali vrste *Streptococcus agalactiae*.

4.1 POGOSTNOST POVZROČITELJEV MASTITISA V VEZANIH REJAH



Slika 6 Razmerje med kužnimi in okoljskimi povzročitelji subkliničnega mastitisa v vezanih rejah;
Figure 6 Relationship between infectious and environmental pathogens of subclinical mastitis in tied farms

Tabela 5 Število subkliničnih primerov mastitisa v vezanih rejah glede na skupino povzročitelja
Table 5 Number of subclinical cases of mastitis in a tied farm according to the causative group

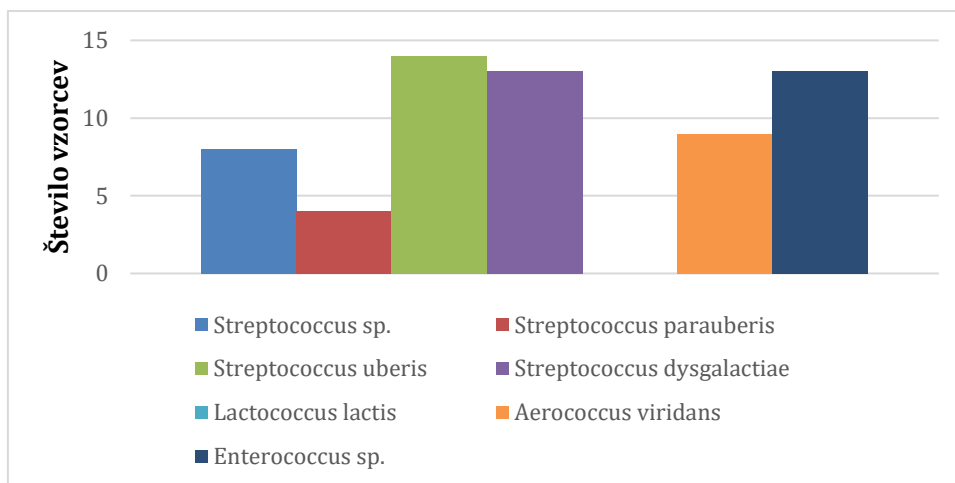
Skupina povzročiteljev	Število pozitivnih vzorcev
<i>Str. agalactiae</i>	0
Drugi streptokoki	61
<i>Staphylococcus aureus</i>	41
Koagulaza negativni stafilokoki	5
Bacilarni povzročitelji	7
Skupno	114

Od skupno 991 vzorcev mleka, iz klinično zdravih vimenskih četrti krav v vezanih rejah, smo v 114 primerih dokazali povzročitelje mastitisa. Kot je razvidno iz tabele 5 in slike 6 smo v 61 (53,51 %) primerih determinirali okoljske vrste streptokokov. Bacilarne povzročitelje smo izolirali 7-krat (19,67 %), 41-krat (35,97 %) smo izolirali *S. aureus* ter 5-krat (4,39 %) koagulaza negativne stafilokoke.

Tabela 6 Okoljske vrste streptokokov subkliničnega mastitisa v vezanih rejah;
Table 6 Environmental species of streptococci pathogens of subclinical mastitis in a tied farms

Okoljski povzročitelj subkliničnega mastitisa	Število okuženih četrti
<i>Streptococcus</i> sp.	8
<i>Streptococcus parauberis</i>	4
<i>Streptococcus uberis</i>	14
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	13
<i>Lactococcus lactis</i>	0
<i>Aerococcus viridans</i>	9
<i>Enterococcus</i> sp.	13
Skupaj	61

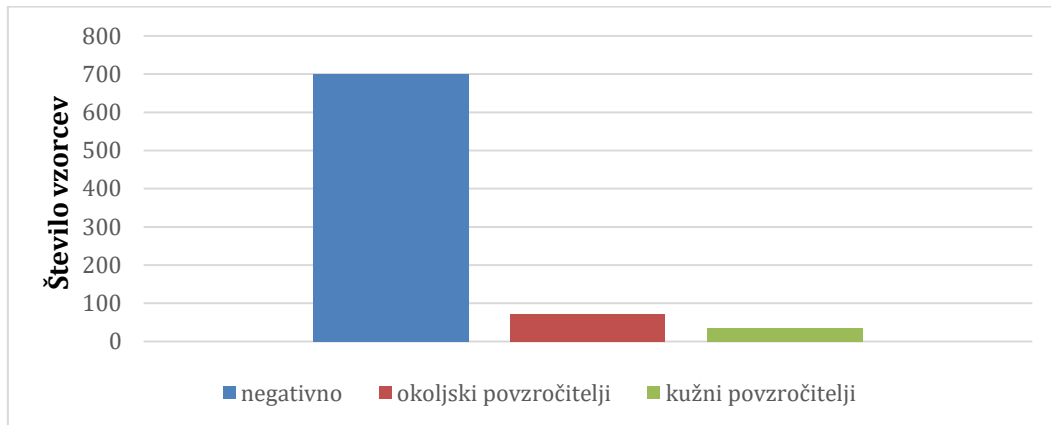
Tabela 6 nam prikazuje, da je bilo v vezanih rejah največ subkliničnih okužb mlečne žleze povzročenih z vrstami *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* in *Enterococcus* sp.



Slika 7 Okoljski povzročitelji subkliničnega mastitisa v vezanih rejah;
Figure 7 Environmental pathogens of subclinical mastitis in tied farms

Slika 7 nam ponazarja, da med okoljskimi povzročitelji prevladujejo *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* in *Enterococcus* sp. Pogosta povzročitelja sta tudi *Streptococcus parauberis* in *Aerococcus viridans*. V osmih vzorcih povzročiteljev žal zaradi nečistih kolonij ni bilo mogoče natančneje determinirati.

4.2 POGOSTNOST POVZROČITELJEV MASTITISA V PROSTIH REJAH



Slika 8 Razmerje med kužnimi in okoljskimi povzročitelji subkliničnega mastitisa v prostih rejah;
Figure 8 Relationship between infectious and environmental pathogens of subclinical mastitis in free stall farms

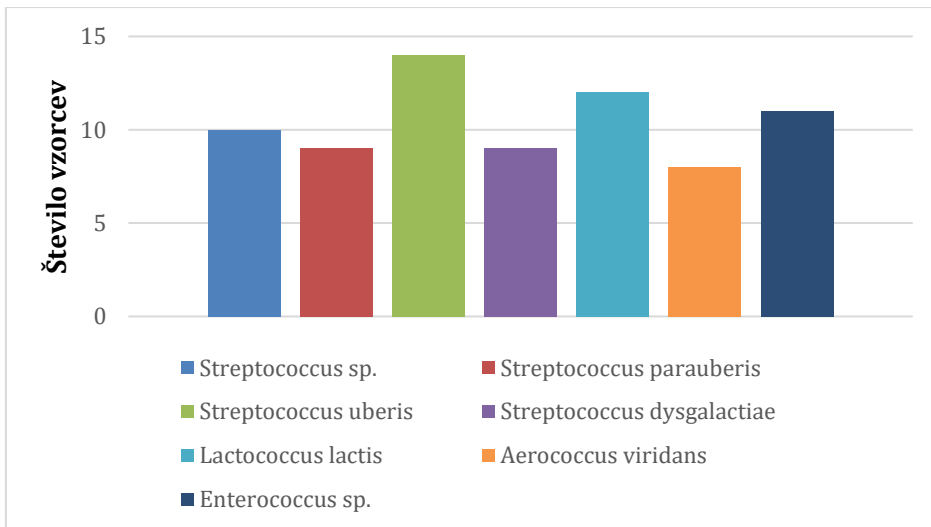
Tabela 7 Število subkliničnih primerov mastitisa v prostih rejah glede na skupino povzročitelja;
Table 7 Number of subclinical cases of mastitis in free stall farms according to the causative group

Skupina povzročiteljev	Število pozitivnih vzorcev
<i>Str. agalactiae</i>	0
Drugi streptokoki	73
<i>Staphylococcus aureus</i>	21
Koagulaza negativni stafilokoki	4
Bacilarni povzročitelji	9
Skupno	107

Kot je vidno na sliki 8, smo od skupno 808 vzorcev mleka iz klinično zdravih vimenskih četrti krav v prostih rejah v 107 primerih dokazali povzročitelje mastitisa. V tabeli 7 je prikazano število subkliničnih primerov mastitisa v prostih rejah glede na skupino povzročitelja. V 73 (68,22 %) primerih smo determinirali okoljske vrste streptokokov. Bacilarne povzročitelje smo izolirali 9-krat (8,41 %), 21-krat (19,63 %) smo izolirali *S. aureus* ter 4-krat (3,74 %) koagulaza negativne stafilokoke.

Tabela 8 Okoljske vrste streptokokov subkliničnega mastitisa v prostih rejah;
Table 8 Environmental species of streptococci pathogens of subclinical mastitis in free stall farms

Okoljski povzročitelj subkliničnega mastitisa	Število okuženih četrti
<i>Streptococcus</i> sp.	10
<i>Streptococcus parauberis</i>	9
<i>Streptococcus uberis</i>	14
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	9
<i>Lactococcus lactis</i>	12
<i>Aerococcus viridans</i>	8
<i>Enterococcus</i> sp.	11
Skupaj	73



Slika 9 Okoljski povzročitelji subkliničnega mastitisa v prostih rejah;
Figure 9 Environmental pathogens of subclinical mastitis in free stall farms

V tabeli 8 in na sliki 9 so prikazani posamezne vrste okoljskih streptokokov povzročiteljev subkliničnega mastitisa v prostih rejah. V prostih rejah je bilo največ subkliničnih okužb mlečne žleze povzročenih z vrstami *Streptococcus uberis*, *Enterococcus* sp. in *Lactococcus lactis*. Povzročitelj *Lactococcus lactis* je bil odkrit v eni reji krav molznic, zato nekoliko spremeni skupne rezultate.

4.3 PRIMERJAVA REJ

Tabela 9 Struktura vzorca glede na obliko reje in vrsto mastitisa;
Table 9 Sample structure according to the form of breeding and the type of mastitis

			Tehnologija reje		Skupaj
			Vešana reja	Prosta reja	
Zgolj mastitisi	Mastitisi kužni	n	53	34	87
		n %	60,92 %	39,08 %	100 %
	Mastitisi okoljski	n	61	73	134
		n %	45,52 %	54,48 %	100%
Skupaj			114	107	221

Tabela 10 Izid χ^2 preizkusa v pojavljanju vrste mastitisa glede na obliko reje;
Table 10 The result of the χ^2 test in the occurrence of the type of mastitis according to the form of breeding

χ^2 preizkus			
	Vrednost	Stopinje prostosti (df)	Statistična pomembnost (P)
Pearsonov χ^2	5,007 ^a	1	0,025
Preizkus enakosti verjetij	5,037	1	0,025
Numerus veljavnih primerov	221		
a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 42,12.			

Kot je prikazano v tabeli 9 in tabeli 10 se v našem vzorcu med vezano in prosto rejo pojavljajo statistično značilne razlike med povzročitelji mastitisa, pri čemer se je več mastitisov, pri katerih smo izolirali kužne povzročitelje pojavljalo v vezanih rejah (60,92 %), medtem ko je bilo več primerov mastitisa, pri katerih smo dokazali okoljske povzročitelje, v prostih rejah (54,48 %).

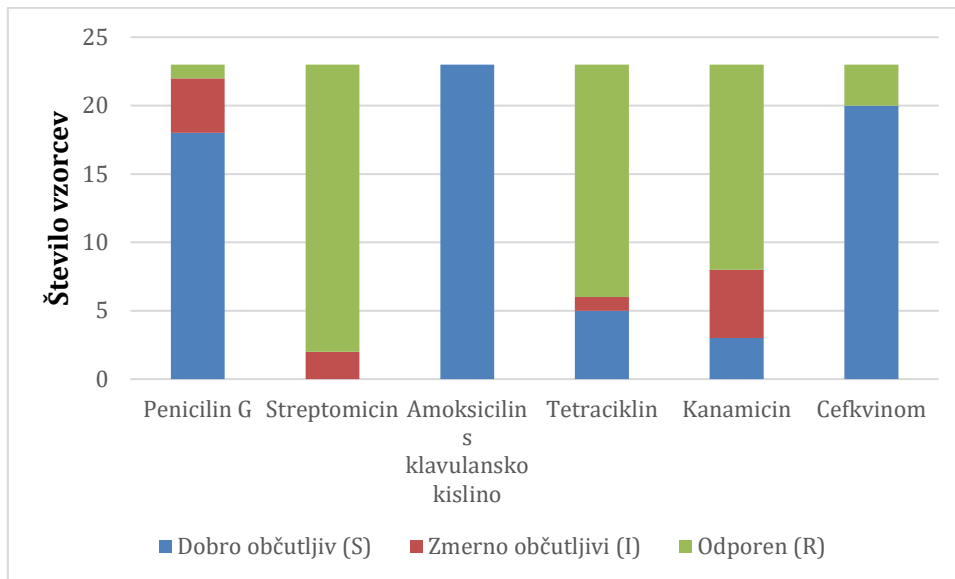
S statistično metodo po Pearsonovem χ^2 preizkusu smo ugotovili, da lahko s tveganjem 2,5 % trdimo, da bi se podobne razlike v razmerju med okoljskimi in kužnimi povzročitelji pojavile tudi v drugih čredah z vezano ali prosto rejo (tabela 10). Podatki o vrednosti nam dokazujejo, da je vrednost χ^2 preizkusa statistično pomembna ($\chi^2 = 5,007$, $df = 1$, $P = 0,025$).

4.4 ANTIBIOGRAM

Pri 23 vzorcih, ki smo jih predhodno uvrstili v rod *Streptococcus*, je bil opravljen preizkus občutljivosti na posamezne antibiotike. Uporabili smo diske, ki so vsebovali penicilin G (OXOID Ltd. UK Penicilin G, 10 μ g), streptomycin (OXOID Ltd. UK Streptomycin, 10 μ g), amoksicilin s klavulansko kislino (OXOID Ltd. UK amoksicilin/klavulanska kislina 2:1, 30 μ g), tetraciklin (OXOID Ltd. UK Tetraciklin, 30 μ g), kanamicin (OXOID Ltd. UK Kanamicin, 30 μ g) in cefkvinom (OXOID Ltd. UK Cefkvinom, 30 μ g).

Tabela 11 Občutljivost bakterij *Streptococcus* spp. na antibiotike;
Table 11 *Streptococcus* spp. Bacterial susceptibility to antibiotics

Antibiotik	Dobro občutljiv (S)	Zmerno občutljiv (I)	Odporen (R)	Skupaj
Penicilin G	18 (78%)	4 (17%)	1 (5%)	23
Streptomycin	0	2 (9%)	21 (91%)	23
Amoksicilin s klavulansko kislino	23 (100%)	0	0	23
Tetraciklin	5 (21%)	1 (5%)	17 (74%)	23
Kanamicin	3 (13%)	5 (22%)	15 (65%)	23
Cefkvinom	20 (87%)	0	3(13%)	23



Slika 10 Občutljivost bakterij na antibiotike;
Figure 10 Bacterial susceptibility to antibiotics

V tabeli 11 in na sliki 10 smo prikazali najpogosteje uporabljene antimikrobne učinkovine in občutljivost posameznih bakterij nanje. Pri preizkusu Amoksicilina z dodatkom klavulanske kisline je v vseh primerih (100 %) prišlo do inhibicije rasti bakterij. Preparati, ki vsebujejo omenjeno učinkovino, se še vedno najpogosteje uporabljajo v klinični praksi za zdravljenje mastitisov. Pogosto se uporabljajo tudi penicilinski preparati (Penicilin G), ki so se izkazali kot učinkoviti v 78 %. Zelo dobre rezultate smo dosegli tudi s Cefkvinom, ki je uspešno deloval na 87 % bakterijskih sevov. Streptomycin, Tetraciklin in Kanamicin so pričakovano pokazali slabše rezultate delovanja na bakterije. Le-ti niso antibiotiki izbora, saj Gram pozitivne bakterijske vrste večinoma niso občutljive nanje.

Pri odčitavanju cone inhibicije smo upoštevali mejne vrednosti po navodilih proizvajalca, ki so navedene v tabeli 12.

Tabela 12 Cone inhibicije rasti bakterij za posamezne antibiotične učinkovine;
Table 12 Bacterial growth inhibition zones for individual antibiotic agents

Ime učinkovine	µg	Kratica	Skupina povzročitelja	Dobro občutljiv (S) v mm	Zmerno občutljiv (I) v mm	Odporen (R) v mm
Penicilin G	10	P	Stafilokoki	29		28
			Streptokoki	28	20 - 27	19
			Enterokoki	15		14
			Listerija	20		19
Streptomycin	10	S		15	12 - 14	11
Amoksisilin s klavulansko kislino	30	AMC	Stafilokoki	20		19
			Drugi	18	14 - 17	13
Tetraciklin	30	TE		22	18 - 21	17
Kanamycin	30	K		18	14 - 17	13
Cefkvinom	30	CEQ		22	19 - 21	18

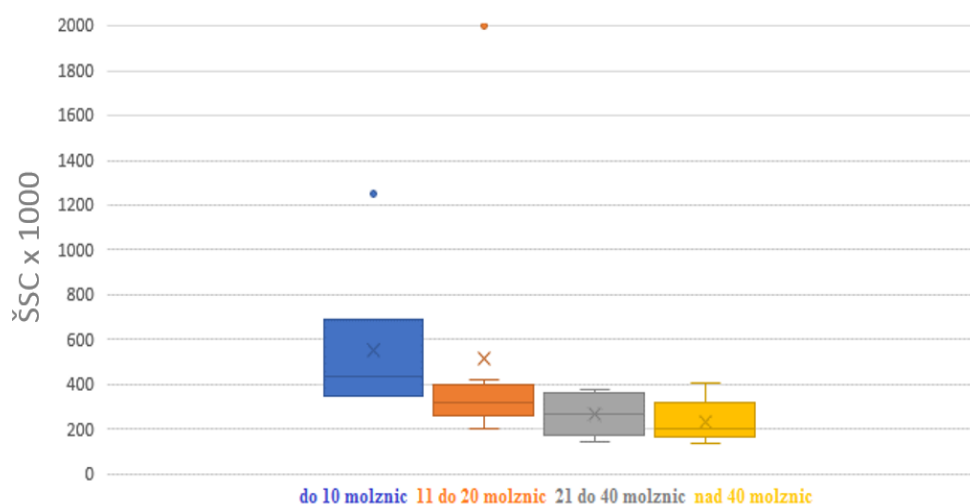
4.5 POVPREČNO ŠTEVILO SOMATSKIH CELIC

V naši raziskavi smo za potrebe ugotavljanja subkliničnih mastitisov poleg mikrobiološke preiskave opravili tudi štetje somatskih celic s pomočjo avtomatskega števca. Skupno število somatskih celic med posameznimi čredami smo primerjali s pomočjo rezultatov mlečnih kontrol. Treh kmetij, ki imajo manj kot 10 molznic in niso v stalni mlečni kontroli, nismo vključili v naš izračun. Povprečje števila somatskih celic je bilo nižje v večjih rejah krav molznic. V čredah, kjer imajo manj kot deset molznic, je bilo povprečno število somatskih celic $553,3 \times 10^3 / \text{ml}$ ŠSC, kar je dvakratnik povprečju v čredah z več kot dvajset molznicami ($266 \times 10^3 / \text{ml}$ ŠSC) in čredah z več kot štirideset molznicami ($235,5 \times 10^3 / \text{ml}$ ŠSC) (Tabela 13).

Tabela 13 Povprečno število somatskih celic glede na velikost črede;
Table 13 Average number of somatic cells according to herd size

Velikost črede	Do 10 molznic	11 do 20 molznic	21 do 40 molznic	Nad 41 molznic
Povprečje ŠSC ($\times 10^3$)/ml	553,3	517,5	266	235,5
Mediana ŠSC ($\times 10^3$)/ml	435	320	265	201,5

Pri pregledu podatkov smo na dveh kmetijah ugotovili zelo visoko število somatskih celic ($2000 \times 10^3 / \text{ml}$ in $1250 \times 10^3 / \text{ml}$), vendar je bil to enkratni dogodek (slika 11).



Slika 11 Porazdelitev vrednosti somatskih celic glede na velikost črede;
Figure 11 Distribution of somatic cell values according to herd size

5 RAZPRAVA

Na področju, ki smo ga zajeli z našo raziskavo, je še vedno bistveno več kmetij z vezano kot s prosto rejo. Izgradnja objektov s prosto rejo je sicer v porastu, vendar so pogosto težave zaradi prostorske stiske ali pomanjkanja finančnih sredstev. Prav tako gre pri prehodu iz vezane na prosto rejo za veliko spremembo, ki vpliva na vse elemente reje od molže, krmljenja, čiščenja, telitev, napajanj do telitev in zdravljenj živali. V naši raziskavi smo se osredotočili na razlike med povzročitelji vimenskih okužb, vendar bi bilo dobro primerjati še druge razlike s področja zdravstvenega varstva molznic glede tehnologije reje. Raziskave zdravja parkljev, števila vnetij sklepov, reprodukcijskih sposobnosti in tehnotipij ter stereotipij v hlevih z vezano in prosto rejo bi doprinesle k izboljšanju zdravja živali.

V prostih rejah je bilo največ subkliničnih okužb mlečne žleze povzročenih z vrstami *Streptococcus uberis*, *Enterococcus* sp. in *Lactococcus lactis*, deset izolatov pa zaradi kontaminiranega vzorca žal ni bilo mogoče natančneje determinirati.. Povzročitelj *Lactococcus lactis* je bil odkrit le v eni reji krav molznic, zato nekoliko spremeni skupne rezultate. Posamezni izolati so najverjetneje posledica posameznega vnosa bakterij v rejo. Za rejce je izjemnega pomena higiena hleva in zaščita pred vnosom povzročiteljev bolezni. Z ločevanjem novih živali od starih (karantena), stalnim preverjanjem zdravstvenega stanja in spremljanjem epizootioloških razmer se lahko rejci zavarujejo pred okužbami.

Okužbe z vrstami iz družine *Enterococcaceae* smo odkrili predvsem pri kravah, ki pogosto ležijo na pregonskih hodnikih in pri kmetijah s premajhnim številom ležalnih boksov. Odkritih je bilo tudi nekaj okužb z vrstami *Aerococcus viridans*, *Streptococcus dysgalactiae* in *Streptococcus parauberis*.

Večina povzročiteljev spada med okoljske, kar je najverjetneje posledica nečistih ležišč, pomanjkanja števila ležišč in posledično ležanja živali na rešetkah. Prav tako prihaja pri prostih rejah do vzpostavljanja hierarhije med živalmi in izbiranja svojega prostora. Šibkejše živali so tako ob pomanjkanju ležišč bolj izpostavljene okoljskim povzročiteljem okužb. Pri prosti reji se živali lahko same odločijo kje bodo ležale, zato lahko prihaja do ležanja na mestih, ki za to niso namenjena (pregonski hodnik, pred krmilno mizo, ob napajalnikih ...). Ta mesta niso suha in čista zato so idealno mesto za razmnoževanje škodljivih mikroorganizmov. V starejših hlevih so pogost problem tudi premajhna ležišča, ki živalim z velikim telesnim okvirjem ne omogočajo primerne

prostora. Zaradi tega živali z zadnjim delom telesa ležijo na pregonskih hodnikih, ki so umazani in so tako vir okoljskih infekcij. Okužbe z vrstami iz družine *Enterococcaceae* so bile odkrite predvsem pri kravah, ki pogosto ležijo na rešetkah in na kmetijah s premajhnim številom ležalnih boksov. Ta podatek nam še dodatno okrepi dejstvo, da je potrebno ozaveščanje rejcev za primerno gradnjo hlevov predvsem iz vidika zdravstvenega varstva molznic. Zanimive rezultate bi prikazale raziskave, ki bi se osredotočile na problematiko načina postavitve elementov v hlevu (napajalniki, krmilna miza, ležišča, krmilna miza) na zdravstveno varstvo molznic, saj bi lahko razkrile rešitve za izboljšanje upravljanja s čredo.

V naši raziskavi je bilo v vezanih rejah največ subkliničnih okužb mlečne žleze povzročenih z vrstami *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* in *Enterococcus* sp. Številne okužbe z bakterijami iz družine *Enterococcaceae* so najverjetneje posledica neustrezne higiene vimena pred molžo. Ker je še vedno pogosto umivanje vimena pred molžo z vodo, prihaja do vnosa bakterij s kože vimena v seskov kanal. Nečista vimena so posledica nečistih in prekratkih ležišč. Zaradi večanja okvirja živali so stojišča prekratka, zato številne živali z zadnjimi nogami in vimenskimi kompleksi ležijo v iztrebkih (na rešetkah, v blatnem kanalu). Prav tako se povečuje število zdravstvenih težav z zadnjimi nogami zaradi prekratkih ležišč, kar podaljša čas ležanja in poveča možnost okužbe vimena.

Številne okužbe z bakterijami iz družine *Enterococcaceae* so predvsem posledica neustrezne higiene vimena pred molžo. Ker je še vedno pogosto umivanje vimena pred molžo z vodo, prihaja do vnosa bakterij s kože vimena v seskov kanal. Spodbujanje rejcev k suhemu čiščenju vimena pred molžo je ključno za zmanjšanje tveganja okužb vimena. Ker smo v naši raziskavi zajeli vse okoljske povzročitelje mastitisa, se nismo osredotočili na posamezno družino, vendar bi bilo v prihodnosti zanimivo raziskati, kako mokro čiščenje vpliva na količino in kakovost mleka.

V Sloveniji je bilo v letu 2018 v čredah z manjšim številom krav v hlevskem vzorcu povprečno več somatskih celic kot v čredah z večjim številom živali (Jenko in sod., 2019). Tudi v naši raziskavi, smo to trditev potrdili za geografsko področje naše raziskave. Rejci z večjim številom živali (nad 20 molznic) se intenzivneje ukvarjajo s prirejo mleka, zato jim je bolj pomembno število somatskih celic, od katerega je odvisna odkupna cena mleka. Poleg tega je obrat (remont) živali v večjih rejah v povprečju hitrejši, kar pomeni, da je v čredi več prvesnic (krav v prvi laktaciji), pri katerih je prevalenca subkliničnega mastitisa nižja.

6 SKLEPI

V vezanih rejah so imeli manj živali, kar je posledica manjših objektov ter manjših površin za pripravo krme. Manjše kmetije nimajo prireje mleka za glavno ekonomsko dejavnost, zato je manj časa in denarja namenjenega skrbi za preventivo zdravstvenega varstva molznic.

Najpogostejši okoljski povzročitelj vnetja mlečne žleze v preiskovanih čredah je bila vrsta *Streptococcus uberis*, ki smo jo dokazali v 28 primerih, kar predstavlja 20,9 % vseh odkritih okoljskih okužb. Vrsta *Str. uberis* je občutljiva na glavna protimikrobna zdravila, zato ne predstavlja večjih težav pri zdravljenju vimenskih okužb.

Med vezano in prosto rejo smo dokazali statistično značilne razlike med posameznimi povzročitelji mastitisa. Več kužnih mastitisov je bilo v vezanih rejah (60,92 %), več okoljskih pa v prostih rejah (54,48 %). S statistično metodo po Pearsonovem χ^2 preizkusu smo ugotovili, da lahko s tveganjem 2,5 % trdimo, da bi se podobne razlike v razmerju med okoljskimi in kužnimi povzročitelji pojavile tudi v drugih čredah z vezano ali prosto rejo. V hlevih s prosto rejo je pomembna še dodatna skrb za higieno vimena in okolja ter redna preventivna preverjanja zdravja mlečne žleze s štejetjem somatskih celic in mikrobiološko preiskavo.

Vseh 23 vzorcev streptokokov, pri katerih smo opravili preizkus na občutljivost na antibiotike, je bilo pričakovano občutljivih na tri najpogosteje uporabljena protimikrobna zdravila. Amoksicilin s klavulansko kislino je v vseh primerih zavrl rast bakterij, Penicilin G je bil učinkovit v 78%, zelo zadovoljiva pa je bila tudi učinkovitost Cefkvinoma in sicer 87%.

V naši raziskavi imajo črede z manjšim številom krav v hlevskem vzorcu povprečno več somatskih celic kot črede z večjim številom živali. Menimo, da je rejcem z večjim številom živali bolj pomembno število somatskih celic, od katerega je odvisna odkupna cena mleka.

7 ZAHVALA

V prvi vrsti gre največja zahvala mentorju prof. dr. Andreju Pengovu za vso pomoč pri zbiranju in obdelavi podatkov, podporo, potrpežljivost, prijaznost, stalno dostopnost in strokovno podporo.

Zahvala gre tudi zaposlenim na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete za strokovno pomoč pri delu.

Hvala mag. Giti Greccs-Smole za pomoč pri citiranju virov.

Iskreno se zahvaljujema recenzentoma doc. dr. Jožici Ježek in dr. Janezu Jeretini za skrben pregled naloge, popravke in pomoč.

Hvala vsem študentom Veterinarske fakultete, ki so pomagali pri vzorčenju mleka.

Hvala vsem lastnikom kmetij, ki so nama omogočili zbiranje vzorcev mleka.

Hvala prijateljem in družini za to, da vedno stojijo ob strani, spodbujajo, vlivajo pogum in podpirajo pri vseh odločitvah.

8 LITERATURA

1. Akineden O, Annemuller C, Hassan AA, Lammler C, Wolter W, Zschock M. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Clin Vaccine Immunol* 2001; 8(5): 959–64.
2. Barnum DA, Newbouldt FHS. The use of California mastitis test for the detection of bovine mastitis. *Can Vet J* 1961; 2: 83–90.
3. Batis J. Dijagnostika mastitisa. *Vet Glasn* 1964; 18: 971–80.
4. Čeru S, Jurčević A, Pengov A. Vpliv posameznih dejavnikov na uspeh zdravljenja vimenskih okužb (mastis) pri kravah, ki jih povzroča *Staphylococcus aureus*. Ljubljana : Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 2000. Raziskovalna naloga
5. Dierig A, Frei R, Egli A. The fast route to microbe identification. *Pediatr Infect Dis J* 2015; 34(1): 97–9.
6. Erskine RJ. Mastitis in cattle [online]. In: MSD veterinary manual. Kenilworth : Merck Sharp and Dohme Co., 2020. <https://www.merckvetmanual.com/reproductive-system/mastitis-in-large-animals/mastitis-in-cattle>
7. Oliver SP, Pighetti GM, Almeida RA, Environmental pathogens. In: Fuquay JW, eds. *Encyclopedia of dairy sciences*. 2nd ed. San Diego : Academic Press, 2011: 415–21.
8. Gregorović V. Bolezni in zdravstveno varstvo prežvekovalcev: skripta. Del 2, Infekcijske bolezni in bolezni vime. Del 2. Ljubljana : Biotehniška fakulteta, 1988: 482–99, 513–21.
9. Jenko J, Jeretina J, Logar B, et al. Rezultati kontrole priraje mleka in mesa: Slovenija 2018. [online] Ljubljana : Kmetijski inštitut, 2019: 21–55.
https://www.govedo.si/files/cpzgss/knjiznica/porocila/kontrola_porocila/REZULTATI_KONTROLE_2018.pdf (5. avg. 2020)

10. Jensen PT. Investigations into the Whiteside test and the CMT for the detection of pathological secretions in herd milk samples. *Nord Vet Med* 1957; 9: 590–608.
11. Jones GM, Pearson RE, Clabaugh GA, Heald CW. Relationship between somatic cells counts and milk production. *Dairy Sci* 1983; 67: 1823–31.
12. Jurca J. Mastitis pri kravah, ugotavljanje, zatiranje in preprečevanje. Ljubljana : Kmečki Glas, 1983: 84–9.
13. Jurčević A, Čeru S. Dejavniki, ki vplivajo na pogostost okužb vimena krav s *Staphylococcus aureus*. Ljubljana : Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 2001. Raziskovalna naloga
14. Kloos WE, Schleifer KH. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol* 1975; 1: 82–8.
15. Maili P, Junttila J, Seppänen J. Detection of subclinical mastitis in ewes. *Br Vet J* 1987; 143: 402–9.
16. Nelson L, Flok JI, Höök M, Lindberg M, Miller HP, Wadström T. Adhensin in staphylococcal mastitis as vaccine components. *Flem Vet J* 1991; 62 (Suppl. 1): 111–25.
17. Paape MJ, Hafs HD, Snyder WW. Variation of estimated numbers of milk somatic cells stained with Wright's stain of pyronin Y-methyl green stain. *J Dairy Sci* 1963; 46 : 1211–6.
18. Pengov A, Klinkon M. Mastitis pri molznicah in z njim povezano število somatskih celic v mleku. *Sod Kmet* 2001; 34(7/8): 326–9.
19. Pengov A, Zadnik T, Pogačnik M. Število somatskih celic v ovčjem mleku glede na bakteriološki status mlečne žleze. *Zb Bioteh Fak Univ Lj* 1996; (Suppl. 24): 97–104.

20. Persson Y, Nyman AKJ, Grönlund-Andersson U. Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. *Acta Vet Scand* 2011; 53: e36. doi: [10.1186/1751-0147-53-36](https://doi.org/10.1186/1751-0147-53-36) (12. 4. 2020)
21. Prescott SC, Breed RS. The determination of the number of body cells in milk by the direct method. *Am J Public Hygiene* 1910; 20(3): 663–4.
22. Quinn PJ, Larter ME, Markey B, Larter GR. *Clinical veterinary microbiology*. London: Mosby-YearBook, 1994: 327–44.
23. Constable PD, Hinchcliff KW, Done SH, Grünberg W. *Veterinary medicine: diseases of mammary gland*. 11th ed. Vol 2. London : Elsevier, 2017; 20: 1904–90.
24. Reller LB, Weinstein M, Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis* 2009; 49 (11): 1749–55.
25. Rodrigues MX, Lima SF, Higgins SH, Canniatti-Brazaca SG, Bicalho RC. The *Lactococcus* genus as potential emerging mastitis pathogen group: a report on an outbreak investigation. *J Dairy Sci* 2016; 99(12): 9864–74.
26. Savage WG. Streptococci and leucocytes in milk. *J Hyg* 1906; 6(2): 123–38.
27. Saishu N, Morimoto K, Yamasato H, Ozaki H, Murase T. Characterization of *Aerococcus viridans* isolated from milk samples from cows with mastitis and manure samples. *J Vet Med Sci* 2015; 77(9): 1037–42.
28. Schalm OW, Noorlander DO. Experiments and observations leading to development of the California mastitis test. *J Am Vet Med Assoc* 1957; 130(5): 199–204.
29. Schubert S, Kostrzewa M. MALDI-TOF MS in the microbiology laboratory: current trends. *Curr Issues Mol Biol* 2017; 23: 17–20.

30. Schulz J. Somatische Zellen in Ziegenmilch. Tierärztl Prax 1994; 22: 438–42.
31. Sepasi Tehrani H, Moosavi-Movahedi AA. Catalase and its mysteries. Prog Biophys Mol Biol 2018; 140: 5–12
32. Sordillo LM. Mammary gland immunobiology and resistance to mastitis. Vet Clin North Am Food Anim Pract 2018; 34(3): 507–23.
33. Stokes WR, Wegefath A. The microscopic examination of milk. J State Med 1897; 5: 439.
34. Timms LL. Can somatic cel counts get too low? In: Proceedings of 29th Annual Meeting National Mastitis Council. Louisville, 1990: 94–101.
35. Tizard IR. Veterinary immunology : an introduction. 4th ed. Philadelphia : WB Saunders, 1992: 1–60.
36. Van Oss CJ. Precipitation and agglutination. J Immunoassay 2000; 21(2/3): 143–64.
37. Varaldo PE, Satta G, Hajek V. Taxonomic study of coagulasa-positive *Staphylococci*: bacteriolytic activity pattern analysis. Int J Syst Bacteriol 1978; 28: 445–8.
38. Vasil M. Etiology, course and reduction of incidence of environmental mastitis in the herd of dairy cows. Slovak J Anim Sci 2009; 42(3): 136–44.
39. Vatovec S. Mlečna žleza in njen izloček. Ljubljana : VTOZD za veterinarstvo Biotehniške fakultete, 1981: 3–8.