

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA



**ANALIZA REZULTATOV TESTIRANJA HLEVSKIH
VZORCEV MLEKA NA 15 POVZROČITELJEV
MASTITISA Z METODO PCR V REALNEM ČASU**

**ANALYSIS OF THE RESULTS OF TESTING BULK
TANK MILK SAMPLES FOR 15 MASTITIS
PATHOGENS USING REAL-TIME PCR**

Tadeja Šavli

LJUBLJANA, 2026

Šavli, T. Analiza rezultatov testiranja hlevskega vzorca mleka na 15 povzročiteljev mastitisa z metodo PCR v realnem času

Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 2026. Strokovno raziskovalno delo.

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA



ANALIZA REZULTATOV TESTIRANJA HLEVSKIH VZORCEV MLEKA NA 15 POVZROČITELJEV MASTITISA Z METODO PCR V REALNEM ČASU

ANALYSIS OF THE RESULTS OF TESTING BULK TANK MILK SAMPLES FOR 15 MASTITIS PATHOGENS USING REAL-TIME PCR

Tadeja Šavli

Strokovno raziskovalno delo je pripravljeno pod mentorstvom asist. dr. Majde Golob in somentorstvom znan. sod. dr. Darje Kušar na Enoti za bakteriologijo in mikologijo Inštituta za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani

LJUBLJANA, 2026

IZVLEČEK

Mastitis je eno najpogostejših obolenj v mlečni proizvodnji, ki povzroča velike ekonomske izgube in vpliva na dobrobit živali. V raziskavi smo želeli ugotoviti, kateri povzročitelji mastitisa se najpogosteje pojavljajo v bazenskih vzorcih mleka s slovenskih kmetij ter če obstaja povezava med določenimi rejnimi praksami in pojavljanjem posameznih povzročiteljev.

V raziskavo smo vključili 89 kmetij iz različnih regij Slovenije. Vzorce mleka smo odvzeli iz zbiralnikov za mleko (bazensko mleko) in jih analizirali z metodo PCR v realnem času (qPCR) na prisotnost 15 različnih povzročiteljev mastitisa. Poleg laboratorijske analize smo s pomočjo vprašalnika pridobili podatke o načinu molže, higieni pred in po molži ter načinu presuševanja krav.

Med najpogosteje zaznanimi kužnimi povzročitelji je bil *Staphylococcus aureus*, med okoljskimi pa kvasovke in *Streptococcus uberis*. Kužni povzročitelji so bili pogostejši na kmetijah, kjer niso izvajali čiščenja in razkuževanja vimena pred in po molži ter pri molži z robotom ali ob uporabi mlekovoda. Pri kmetijah, kjer so ob presuševanju uporabljali kombinacijo antibiotikov in čepkov, smo zaznali najmanj kužnih povzročiteljev. Pri okoljskih povzročiteljih se je ob uporabi antibiotikov ob presuševanju njihova pojavnost v mleku nekoliko zmanjšala.

Ugotovili smo, da je qPCR primerna metoda za rutinsko spremljanje najpogostejših povzročiteljev mastitisa v hlevskih vzorcih mleka ter da sta dosledna higiena in izbira ustreznega načina presuševanja pomembna dejavnika pri obvladovanju te bolezni.

Ključne besede: mastitis, hlevski (bazenski) vzorec mleka, povzročitelji mastitisa, PCR v realnem času (qPCR), higiena molže, presuševanje mlečnih krav

ABSTRACT

Mastitis is one of the most common diseases in dairy production, causing major economic losses and affecting animal welfare. In this study, we aimed to determine which mastitis pathogens are most frequently detected in the bulk tank milk samples from Slovenian farms and whether certain management practices are associated with their occurrence.

In this study, we included 89 farms from various regions of Slovenia. Milk samples were collected from the milk bulk tanks and analysed using real-time PCR (qPCR) to detect 15 different mastitis pathogens. In addition to laboratory testing, we collected data on milking methods, udder hygiene before and after milking, and drying-off practices using a structured questionnaire.

The most frequently detected contagious pathogen was *Staphylococcus aureus*, while yeasts and *Streptococcus uberis* were the most common environmental pathogens. Contagious pathogens were more prevalent on farms that did not perform cleaning and disinfection of udders before and after milking and on farms using robotic or pipeline milking systems. The lowest number of contagious pathogens was found on farms that used a combination of antibiotics and teat sealants during the drying-off period. The use of antibiotics alone at drying-off was also associated with a slightly reduced presence of environmental pathogens.

We can conclude that real-time PCR is a suitable method for routine monitoring of mastitis pathogens in the bulk tank milk samples and that proper udder hygiene and drying-off protocols are important factors in controlling this disease.

Keywords: mastitis, bulk tank milk, mastitis-causing pathogens, real-time PCR (qPCR), milking hygiene, dry-off of dairy cows

KAZALO VSEBINE

KAZALO PREGLEDNIC.....	6
KAZALO SLIK.....	7
KAZALO PRILOG.....	8
SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV.....	9
1. UVOD.....	10
1.1. MASTITIS.....	10
1.2. DIAGNOSTIKA MASTITISA.....	11
1.2.1. Pomen hlevskega (bazenskega) vzorca mleka.....	11
1.2.2. PCR v realnem času (qPCR).....	11
2. MATERIALI IN METODE.....	13
2.1. ZASNOVA RAZISKAVE IN SODELUJOČE KMETIJE.....	13
2.2. MOLEKULARNA ANALIZA VZORCEV MLEKA.....	13
2.3. VSEBINA VPRAŠALNIKA IN OBDELAVA PODATKOV.....	14
3. REZULTATI.....	16
3.1. POJAVNOST POVZROČITELJEV MASTITISA V SLOVENIJI.....	16
3.2. POGOSTOST OPRAVLJANJA BAKTERIOLOŠKIH ANALIZ NA PREISKOVANIH KMETIJAH.....	17
3.3. POJAVLJANJE POVZROČITELJEV MASTITISA GLEDE NA VELIKOST PREISKOVANIH KMETIJ.....	18
3.3.1. Zastopanost preiskovanih kmetij po velikosti.....	18
3.3.2. Pojavljanje povzročiteljev mastitisa v povezavi z velikostjo preiskovanih kmetij.....	19
3.4. POJAVLJANJE POVZROČITELJEV MASTITISA PO SLOVENSKIH REGIJAH.....	20
3.4.1. Zastopanost preiskovanih kmetij po statističnih regijah Slovenije.....	20
3.4.1.1. Veljavnost podatkov glede na delež vzorcev po regijah.....	20
3.4.2. Pojavljanje povzročiteljev mastitisa po statističnih regijah Slovenije.....	21
3.4.3. Sklep: Najbolj razširjeni povzročitelji mastitisa po Sloveniji.....	22
3.5. POJAVLJANJE POVZROČITELJEV MASTITISA V POVEZAVI Z NAČINOM MOLŽE.....	24
3.5.1. Pojavljanje kužnih povzročiteljev mastitisa v povezavi z načinom molže.....	24

3.5.2. Pojavljanje okoljskih povzročiteljev mastitisa v povezavi z načinom molže	27
3.6. POJAVLJANJE POVZROČITELJEV MASTITISA V POVEZAVI S PROTOKOLOM ČIŠČENJA IN RAZKUŽEVANJA PRED IN PO MOLŽI	28
3.6.1. Zastopanost preiskovanih kmetij glede na protokol čiščenja in razkuževanja pred in po molži	28
3.6.2. Pojavljanje kužnih povzročiteljev mastitisa v primerjavi s protokolom čiščenja in razkuževanja pred in po molži	29
3.6.3. Pojavljanje okoljskih povzročiteljev mastitisa v primerjavi s protokolom čiščenja in razkuževanja pred in po molži	29
3.7. POJAVLJANJE POVZROČITELJEV MASTITISA GLEDE NA NAČIN PRESUŠEVANJA KRAV MOLZNIC	31
3.7.1. Zastopanost preiskovanih kmetij glede na način presuševanja krav molznic	31
3.7.2. Pojavljanje kužnih povzročiteljev mastitisa glede na način presuševanja krav molznic	32
3.7.3. Pojavljanje okoljskih povzročiteljev mastitisa glede na način presuševanja krav molznic	33
3.8. ODPRTA/ZAPRTA ČREDA IN PRISOTNOST KUŽNIH POVZROČITELJEV MASTITISA	34
3.8.1. Zastopanost preiskovanih kmetij glede na status reje	34
3.8.2. Pojavnost kužnih povzročiteljev mastitisa glede na status reje	34
3.9. POJAVLJANJE GENA ZA ODPORNOST PROTI PENICILINU	35
3.9.1. Delež vzorcev glede na prisotnost gena za odpornost proti penicilinu	35
4. RAZPRAVA	36
5. SKLEPI	41
6. ZAHVALE	42
7. LITERATURA IN VIRI	43
8. PRILOGE	46
PRILOGA 1: VPRAŠALNIK ZA REJCE »SUROVO MLEKO KOT POTENCIALNI VIR VEČKRATNO ODPORNIH BAKTERIJ IN GENOV ZA ODPORNOST«	46

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Zastopanost velikostnih razredov števila govedi na slovenskih kmetijskih gospodarstvih leta 2020.....	18
---	-----------

KAZALO SLIK

Slika 1: Grafični prikaz deleža pozitivnih vzorcev glede na preiskovane povzročitelje	16
Slika 2: Grafični prikaz pogostosti opravljanja bakterioloških analiz za preiskovane kmetije	17
Slika 3: Grafični prikaz zastopanosti preiskovanih kmetij glede na število krav molznic	18
Slika 4: Grafični prikaz pojavljanja povzročiteljev mastitisa v povezavi z velikostjo preiskovanih kmetij	19
Slika 5: Grafični prikaz zastopanosti preiskovanih kmetij po statističnih regijah Slovenije	20
Slika 6: Grafični prikaz pojavljanja povzročiteljev mastitisa po statističnih regijah Slovenije	21
Slika 7: Grafični prikaz pojavljanja povzročiteljev mastitisa v povezavi z načinom molže	24
Slika 8: Grafični prikaz pojavljanja kužnih povzročiteljev mastitisa v povezavi z načinom molže	25
Slika 9: Grafični prikaz pojavljanja bakterije <i>S. aureus</i> v povezavi z načinom molže	25
Slika 10: Grafični prikaz pojavljanja bakterije <i>S. agalactiae</i> v povezavi z načinom molže	26
Slika 11: Grafični prikaz pojavljanja okoljskih povzročiteljev mastitisa v povezavi z načinom molže	27
Slika 12: Grafični prikaz zastopanosti preiskovanih kmetij glede na protokol čiščenja in razkuževanja pred in po molži	28
Slika 13: Grafični prikaz pojavljanja kužnih povzročiteljev mastitisa v primerjavi z protokolom čiščenja in razkuževanja pred in po molži	29
Slika 14: Grafični prikaz pojavljanja okoljskih povzročiteljev mastitisa v primerjavi s protokolom čiščenja in razkuževanja pred in po molži	30
Slika 15: Grafični prikaz zastopanosti preiskovanih kmetij glede na način presuševanja krav molznic	31
Slika 16: Grafični prikaz pojavljanja kužnih povzročiteljev mastitisa glede na način presuševanja krav molznic	32
Slika 17: Grafični prikaz pojavljanja okoljskih povzročiteljev mastitisa glede na način presuševanja krav molznic	33
Slika 18: Grafični prikaz zastopanosti preiskovanih kmetij glede na status reje	34
Slika 19: Grafični prikaz pojavnosti kužnih povzročiteljev mastitisa glede na status reje	34
Slika 20: Grafični prikaz deleža vzorcev glede na prisotnost gena za odpornost proti penicilinu	35

KAZALO PRILOG

Priloga 1: Vprašalnik za rejce »Surovo mleko kot potencialni vir večkratno odpornih bakterij in genov za odpornost«

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

APP – proteini akutne faze (*angl.* acute phase proteins)

CMT – Kalifornija mastitis test (*angl.* California mastitis test)

EU – Evropska unija

IMP-VF – Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani

PCR – verižna reakcija s polimerazo (*angl.* polymerase chain reaction)

qPCR – PCR v realnem času (kvantitativni PCR)

SCC – število somatskih celic (*angl.* somatic cell count)

1. UVOD

1.1. MASTITIS

Mastitis je vnetje mlečne žleze in je najpogostejša bolezen krav molznic, ki povzroča ekonomske izgube zaradi zmanjšane količine in slabše kakovosti mleka. Povzročajo ga različni patogeni, med katerimi so najpogostejše po Gramu pozitivne in po Gramu negativne bakterije, poleg teh pa tudi glive in mikoplazme. Povzročitelje mastitisa delimo na infekcijske oz. kužne (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* in *Mycoplasma spp.*), ki se prenašajo preko mleka, in okoljske (npr. *Escherichia coli*, *Enterococcus spp.*, koagulaza negativni stafilokoki in *Streptococcus uberis*), ki načeloma v mlečno žlezo običajno pridejo iz okolja (Cheng & Han, 2020; Couture in sod., 2019).

Mastitis pri govedu klasificiramo v tri razrede glede na stopnjo vnetja: klinični, subklinični in kronični mastitis (Cheng & Han, 2020).

Klinični mastitis hitro opazimo zaradi vidnih nepravilnosti kot so rdeče, otečeno in na dotik boleče vime. V mleku lahko opazimo kri, spremenjena je barva mleka, vonj mleka je zelo neprijeten, prisotni pa so tudi strdki mleka. Poleg tega je spremenjeno tudi splošno stanje živali. Prizadeta žival ima povišano telesno temperaturo, zmanjšan apetit, lahko se pojavijo tudi prebavne motnje in znaki dehidracije (Cargill, 2021; Cheng & Han, 2020; Wieland, 2024). Glede hitrosti poteka bolezni in pojava kliničnih znakov lahko klinični mastitis razvrstimo v tri oblike: perakuten, akuten in subakuten. Hude oblike vnetja so lahko tudi življenjsko ogrožajoče (Cheng & Han, 2020).

Subklinični mastitis pomeni prisotnost okužbe brez očitnih znakov lokalnega ali sistemskega vnetja. Kljub temu pa se lahko pojavijo občasna obdobja spremenjenega mleka. Produkcija mleka se niža sorazmerno z višanjem števila somatskih celic (SCC; *angl.* somatic cell count) v mleku (Cheng & Han, 2020; Wieland, 2024).

Mastitis označimo kot kroničen, če je okužba prisotna več kot dva meseca. V tem primeru vnetje v mlečni žlezi navadno traja več mesecev, z vmesnimi kliničnimi izbruhi. Mleko navadno ni spremenjeno, zaznamo predvsem visoko vrednost SSC (Cheng & Han, 2020; Wieland, 2024).

Glede na obdobje pojava okužbe razlikujemo med mastitisi v času laktacije in mastitisi v obdobju presušitve. Največ mastitisov se pojavi v začetnem obdobju laktacije, medtem ko je največja nevarnost za razvoj okužbe v začetku presušitve. Živali med laktacijo so pod večjim nadzorom glede morebitnih okužb kakor presušene, zato se pri slednjih mastitis najpogosteje odkrije šele ob začetku naslednje laktacije. Zaradi

prenehanja molže v presušitvi se mikroorganizmi v seskovem kanalčku ne odstranjujejo več 2-3x na dan z molžo, prav tako pa seski niso več redno razkuženi. Poleg že obstoječega stresa zaradi visoke brejosti dodatni stres povzročata tudi sprememba okolja in prehrane (Couture in sod., 2019).

1.2. DIAGNOSTIKA MASTITISA

Za učinkovito zdravljenje in zniževanje stroškov mastitisa je pomembna zgodnja diagnoza okužbe. Ugotavljanje vrednosti SCC in detekcija povzročiteljev sta glavna in najpomembnejša pristopa. Mastitis je opredeljen z vrednostjo SCC nad 200.000 celic/ml; če le-ta perzistira dlje časa, pa se mastitis šteje za kroničnega. Kalifornija mastitis test (*angl.* California mastitis test) nam omogoči osnovno, poceni in hitro diagnozo, saj pozitiven test odraža povišano število (200.000 – 5.000.000) levkocitov na mililiter vzorčenega mleka. V zadnjih letih se pri diagnostiki mastitisa vse pogosteje uporablja masna spektrofotometrija MALDI-TOF in molekularna metoda PCR v realnem času (kvantitativni PCR; qPCR). Poslužujemo pa se lahko tudi detekcije proteinov akutne faze (*angl.* acute phase proteins; APP), ki se že uporabljajo pri klinični zaznavi vnetja v serumu. Ultrazvok vimena nam lahko pokaže prisotnost lezij ali drugih sprememb v notranjosti, ki se lahko pojavijo pri mastitisu (Tommasoni in sod., 2023).

1.2.1. Pomen hlevskega (bazenskega) vzorca mleka

Analiza bazenskega vzorca mleka s posamezne kmetije je danes široko uporabljena metoda za oceno kvalitete mleka in nadziranje zdravja vimena živali v čredi. Redno testiranje ter kontrola mleka na prisotnost bakterij in število SCC lahko predstavljata pomemben podatek o stanju črede. Ob ustrezni interpretaciji rezultatov z upoštevanjem načina upravljanja kmetije predstavlja osnovo za ugotavljanje kvalitete mleka in morebitne težave s pojavom mastitisov (Jayarao & Wolfgang, 2003).

Za diagnozo in nadziranje zdravja mlečne žleze je sicer bolj zanesljiva analiza vzorcev mleka posameznih krav, vendar pa je analiza bazenskega vzorca cenejša, hitrejša in bolj primerna za oceno stanja v celotni čredi (Jayarao & Wolfgang, 2003).

1.2.2. PCR v realnem času (qPCR)

Metoda qPCR je občutljiva molekularna diagnostična metoda, ki omogoča specifično zaznavanje ter relativno kvantifikacijo tarčnih nukleinskih kislin v vzorcih, tj. nukleinskih kislin, ki pripadajo izbranim tarčam ali (mikro)organizmom. Temelji na enakem principu kot klasična metoda PCR, vendar vključuje fluorescenčne označevalce, ki omogočajo spremljanje povečevanja količine pomnožene DNA med potekom reakcije in s tem tudi oceno količine tarče v začetnem vzorcu. Zaradi visoke občutljivosti, specifičnosti in

možnosti kvantifikacije je metoda qPCR postala nepogrešljivo orodje v laboratorijski diagnostiki. Uporablja se za hitro odkrivanje patogenih mikroorganizmov pri živalih, pogosto že v zgodnjih fazah okužbe, ko klasične metode še ne dajejo zanesljivih rezultatov. Uporablja se lahko tudi za diagnostiko mastitisa pri kravah molznicah, kjer omogoča identifikacijo povzročiteljev kliničnih in subkliničnih oblik bolezni. S qPCR je možno v mleku neposredno ugotavljati DNA najpogostejših povzročiteljev mastitisa, kar omogoča hitro ukrepanje in ustrezno izbiro terapijskega pristopa. Poleg individualne diagnostike se metoda uporablja tudi za spremljanje zdravstvenega stanja črede, v okviru katerega pregledamo več vzorcev hkrati ali skupinske vzorce za oceno stanja celotne črede. Ključna prednost metode qPCR pred klasičnimi metodami je njena hitrost in možnost avtomatizacije, kar bistveno skrajša čas od odvzema vzorca do diagnoze. Med slabosti in omejitve metode qPCR pa prištevamo višji strošek analize in zaznavanje prisotnosti DNA tako živih kot mrtvih mikro(organizmov), metoda pa tudi ne omogoča izolacije patogena in s tem izdelave antibiograma (Golob in sod., 2025).

2. MATERIALI IN METODE

2.1. ZASNOVA RAZISKAVE IN SODELUJOČE KMETIJE

Raziskava je bila izvedena v okviru znanstvenoraziskovalnega programa »Zdravje živali, okolje in varna hrana« (P4-0092) ter bilateralnega znanstvenega projekta »Surovo mleko kot potencialni vir večkratno odpornih bakterij in genov za odpornost« (BI-RS/23-25-007), v okviru katerega so sodelovali raziskovalci iz Slovenije (Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani; IMP-VF) in Srbije (Veterinarska fakulteta, Univerza v Beogradu). Namen raziskave je bil ugotoviti prisotnost povzročiteljev mastitisa v hlevskih (bazenskih) vzorcih mleka s pomočjo metode qPCR ter preko anketnih vprašalnikov zbrati osnovne podatke o rejnih in higienskih praksah, povezanih s prirejo mleka.

V raziskavo je bilo vključenih 89 kmetij z območja celotne Slovenije. Na vsaki izmed teh kmetij je sodelujoči veterinar ali rejec v obdobju od 18. oktobra 2024 do 14. februarja 2025 odvzel približno 300 ml vzorca bazenskega mleka. Hkrati z odvzemom vzorca mleka je rejec izpolnil tudi anketni vprašalnik (**Priloga 1**). Vzorci mleka so bili po odvzemu ustrezno transportirani v laboratorij pod pogoji hladne verige.

2.2. MOLEKULARNA ANALIZA VZORCEV MLEKA

Analizo vzorcev z metodo qPCR so izvedli raziskovalci laboratorija Enote za bakteriologijo in mikologijo IMP-VF.

Uporabljen je bil diagnostični komplet VetMAX™ MastiType Multi Kit (Thermo Fisher Scientific), ki omogoča hitro in specifično identifikacijo 15 različnih povzročiteljev mastitisa ter gena za odpornost proti penicilinu (β -laktamaza) v vzorcih surovega mleka.

Skupno je bila v vsakem vzorcu testirana prisotnost naslednjih tarč:

- *Corynebacterium bovis*
- *Enterococcus* spp.
- *Escherichia coli*
- *Klebsiella oxytoca* / *Klebsiella pneumoniae*
- kvasovke
- *Mycoplasma bovis*
- *Mycoplasma* spp.
- *Prototheca* spp.

- *Serratia marcescens*
- *Staphylococcus aureus*
- *Staphylococcus* spp.
- *Streptococcus agalactiae*
- *Streptococcus dysgalactiae*
- *Streptococcus uberis*
- *Trueperella pyogenes* / *Peptoniphilus indolicus*
- gen za odpornost proti penicilinu

Laboratorijsko delo je potekalo skladno s standardiziranim protokolom proizvajalca diagnostičnega kompleta, kar je vključevalo izolacijo nukleinskih kislin iz bazenskega vzorca mleka (po prilagojenem protokolu s komercialnim kompletom DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen), pripravo reakcijskih mešanic in pomnoževanje nukleinskih kislin v reakciji qPCR ter interpretacijo rezultatov analize.

2.3. VSEBINA VPRAŠALNIKA IN OBDELAVA PODATKOV

Vsak rejec je ob odvzemu vzorca mleka samostojno ali ob pomoči veterinarja izpolnil anketni vprašalnik. Vprašalniki niso bili anonimni, saj so rejci navedli osebne podatke (ime, priimek, naslov, v nekaterih primerih tudi kontaktni e-naslov ali telefonsko številko), kar je bilo nujno za sporočanje rezultatov analize. Vsi rejci so bili seznanjeni z namenom raziskave in so s podpisom potrdili, da se strinjajo s sodelovanjem v raziskavi ter da lahko anonimizirane rezultate raziskave predstavimo v strokovnih in znanstvenih krogih.

Vsebina vprašalnika je bila strukturirana in je zajemala naslednje sklope:

- Splošni podatki: statistična regija Slovenije, datum odvzema mleka
- Prireja mleka: razlogi za prirejo, število in status skrbnikov
- Rejski sistem: način reje, uporabljen nastilj, način odstranjevanja gnoja
- Zdravstveni status črede: ločevanje živali glede na status, status reje (zaprta/odprta), prisotnost drugih zdravstvenih težav
- Podatki o čredi: pasma krav, število krav, velikost kmetije (majhna, srednja, velika), ocenjena dnevna proizvodnja mleka

- Molža: način molže, pogostost čiščenja molzišča, način čiščenja, protokol čiščenja in razkuževanja pred in po molži
- Somatske celice in bakterijske analize: SCC v bazenskem mleku v času vzorčenja, ravnanje z mlekom krav s povišanim številom SCC, izvajanje bakterioloških analiz
- Zdravljenje in preprečevanje mastitisa: postopki presuševanja krav, število primerov kliničnega mastitisa na mesec, protokoli zdravljenja, uporabljeni antibiotiki
- Dodatne informacije: druga zdravstvena problematika, splošne opombe

Podatke iz vprašalnikov smo prepisali in analizirali z uporabo programa Microsoft Excel. Izvedli smo osnovno deskriptivno analizo (npr. štetje pojavnosti odgovorov in primerjava med kmetijami).

3. REZULTATI

3.1. POJAVNOST POVZROČITELJEV MASTITISA V SLOVENIJI

Ugotovili smo, da so bili v vzorcih bazenskega mleka med okoljskimi povzročitelji mastitisa na preiskovanih kmetijah najbolj razširjene kvasovke (88 % pozitivnih vzorcev), *S. uberis* (80 % pozitivnih vzorcev), *Enterococcus spp.* (69 % pozitivnih vzorcev) in *E. coli* (61 % pozitivnih vzorcev). Manj pogosto so bili vzorci pozitivni npr. na bakterijo *S. marcescens* (8 % pozitivnih vzorcev) (**slika 1**).

Rezultati analize so pokazali, da je med kužnimi povzročitelji mastitisa najbolj razširjen *S. aureus* (49 % pozitivnih vzorcev), medtem ko so bile bakterije vrste *S. agalactiae* (9 % pozitivnih vzorcev) ugotovljene v manjšem številu vzorcev (**slika 1**).

V naši raziskavi je bil delež vzorcev, pozitivnih na *T. pyogenes* kar 58 % (**slika 1**), kar potrjuje njihovo pomembno prisotnost v populaciji krav z mastitisom.



Slika 1: Grafični prikaz deleža pozitivnih vzorcev glede na preiskovane povzročitelje

3.2. POGOSTOST OPRAVLJANJA BAKTERIOLOŠKIH ANALIZ NA PREISKOVANIH KMETIJAH

Večina kmetij, vključenih v analizo, opravlja bakteriološke analize več kot enkrat letno (48 %), ostale kmetije pa manj kot enkrat letno (18 %) ali pa sploh ne (28 %). Manjši delež (6 %) kmetij opravlja bakteriološke preiskave pred presušitvijo, kar je izrednega pomena, saj je vime ravno v začetku presušitve najbolj nagnjeno k okužbi (**slika 2**).

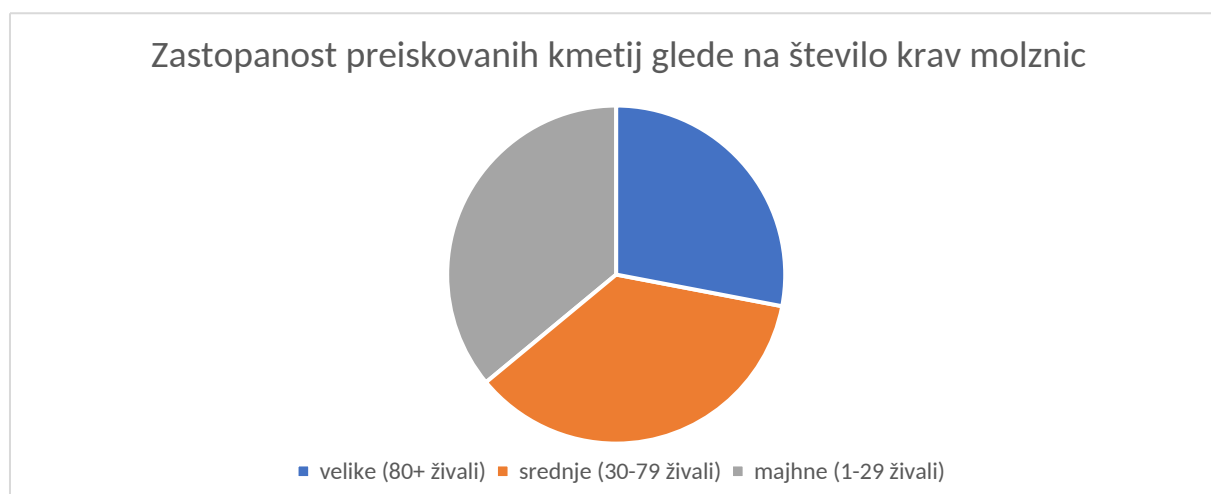


Slika 2: Grafični prikaz pogostosti opravljanja bakterioloških analiz za preiskovane kmetije

3.3. POJAVLJANJE POVZROČITELJEV MASTITISA GLEDE NA VELIKOST PREISKOVANIH KMETIJ

3.3.1. Zastopanost preiskovanih kmetij po velikosti

V raziskavo smo zajeli približno enak delež vzorcev bazenskega mleka iz različno velikih kmetij. Med preiskovanimi kmetijami so prevladovale majhne kmetije (36 %), kjer redijo do 30 krav molznic, in srednje velike kmetije (36 %) z 30 do 80 kravami molznicami, medtem ko je bilo velikih kmetij z več kot 80 molznicami malenkost manj (28 %) (**slika 3**).



Slika 3: Grafični prikaz zastopanosti preiskovanih kmetij glede na število krav molznic

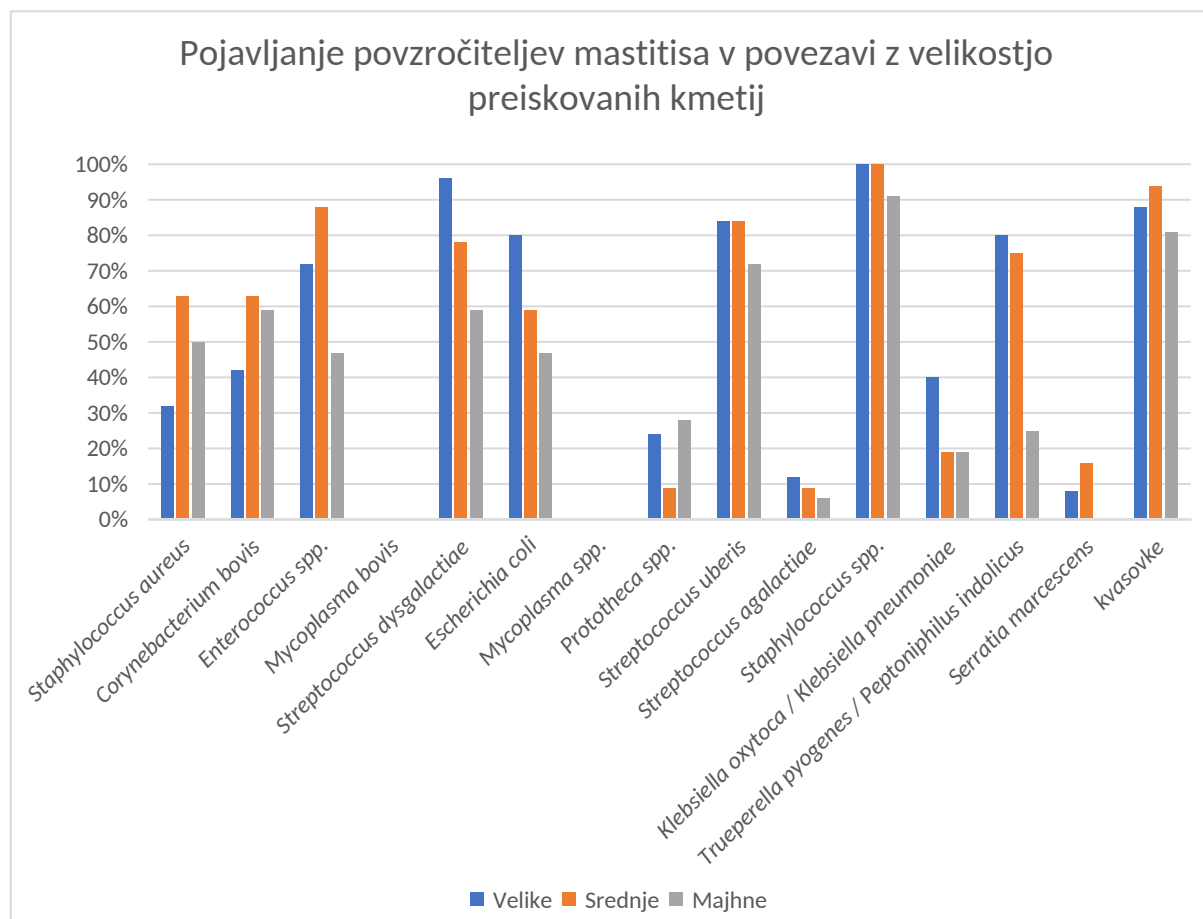
Po podatkih SiStat je bilo v Sloveniji leta 2020 registriranih 28 492 kmetijskih gospodarstev govedi. Od tega jih je bilo 24.541 z 1-29 glav govedi, 3.454 z 30-99 glav govedi in 497 s 100 in več glavami govedi (SiStat, 2020) (**preglednica 1**).

Preglednica 1: Zastopanost velikostnih razredov števila govedi na slovenskih kmetijskih gospodarstvih leta 2020

Velikostni razred števila govedi	Število kmetijskih gospodarstev, 2020
1-29	24.541
30-99	3.454
100 in več	497
SKUPAJ	28.492

3.3.2. Pojavljanje povzročiteljev mastitisa v povezavi z velikostjo preiskovanih kmetij

Kužni povzročitelji mastitisa so bili bolj razširjeni med srednje velikimi (*S. aureus*) in velikimi (*S. agalactiae*) kmetijami (**slika 4**).



Slika 4: Grafični prikaz pojavljanja povzročiteljev mastitisa v povezavi z velikostjo preiskovanih kmetij

3.4. POJAVLJANJE POVZROČITELJEV MASTITISA PO SLOVENSKIH REGIJAH

3.4.1. Zastopanost preiskovanih kmetij po statističnih regijah Slovenije

Največ vzorcev je bilo zbranih iz Jugovzhodne (25 %), Savinjske (19 %), Osrednjeslovenske (18 %) in Podravske (12 %) regije; najmanj vzorcev pa iz Primorsko-notranjske (1 %) in Koroške (2 %) regije (**slika 5**).



Slika 5: Grafični prikaz zastopanosti preiskovanih kmetij po statističnih regijah Slovenije

3.4.1.1. Veljavnost podatkov glede na delež vzorcev po regijah

Skupno smo analizirali 89 vzorcev, porazdeljenih med deset slovenskih regij. Pri interpretaciji rezultatov smo upoštevali, iz katerih regij je bilo zbranih dovolj vzorcev za smiselno statistično analizo.

Regije z najmanjšim deležem vzorcev, zaradi česar njihovi rezultati niso bili reprezentativni, so bile:

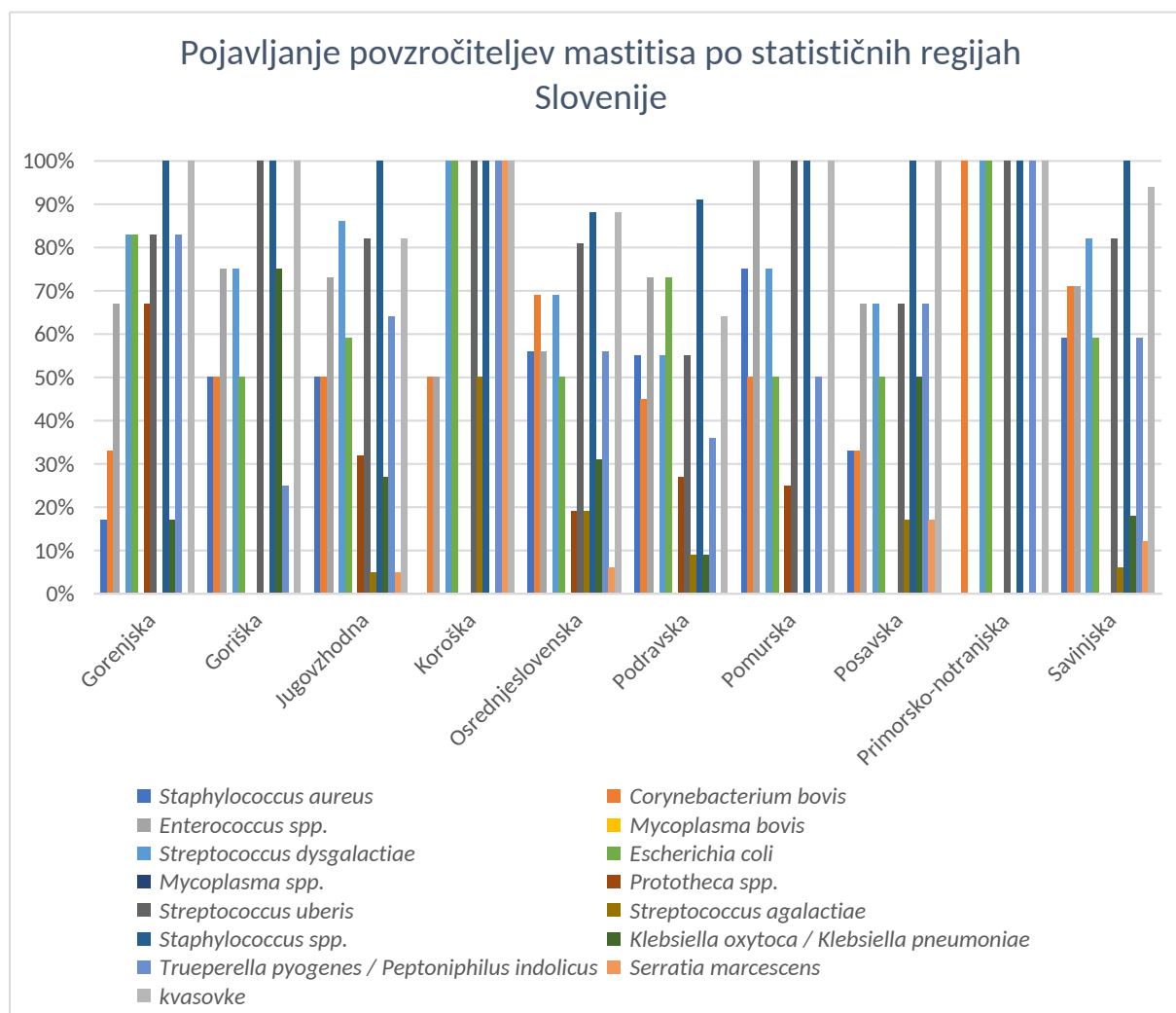
- Primorsko-notranjska regija – le 1 % vseh vzorcev (1 vzorec)
- Koroška regija – 2 % vseh vzorcev (2 vzorca)
- Goriška regija – 4 % vseh vzorcev (4 vzorci)
- Pomurska regija – 4 % vseh vzorcev (4 vzorci)

Zaradi tako nizkega števila vzorcev rezultate iz teh regij lahko obravnavamo le kot indikativne in ne omogočajo zanesljivih sklepov o pogostosti pojavljanja posameznih povzročiteljev mastitisa.

Preostale regije, zlasti Jugovzhodna (25 %), Savinjska (19 %), Osrednjeslovenska (18 %) in Podravska (12 %), so prispevale bistveno več vzorcev in zato omogočale bolj zanesljivo interpretacijo podatkov.

3.4.2. Pojavljanje povzročiteljev mastitisa po statističnih regijah Slovenije

Analiza vzorcev iz različnih regij Slovenije je pokazala raznoliko prisotnost povzročiteljev mastitisa. Najpogosteje zaznani povzročitelji so se med regijami nekoliko razlikovali, vendar so se nekateri mikroorganizmi pojavljali skoraj povsod (slika 6).



Slika 6: Grafični prikaz pojavljanja povzročiteljev mastitisa po statističnih regijah Slovenije

Na Gorenjskem so bile v vseh vzorcih prisotne kvasovke (100 %), zelo pogoste pa so bile tudi bakterije *S. dysgalactiae*, *E. coli*, *S. uberis* in *T. pyogenes*, ki so se pojavile v 83 % vzorcev (**slika 6**).

Na Goriškem smo prav tako v vseh vzorcih (100 %) ugotovili prisotnost kvasovk in bakterij *S. uberis*, medtem ko so bili *Enterococcus spp.*, *S. dysgalactiae* in *K. oxytoca* prisotni v 75 % vzorcev (**slika 6**).

V jugozahodni Sloveniji so prevladovale bakterije *S. dysgalactiae* (86 %), sledile pa so bakterije *S. uberis* in kvasovke (prisotne v 82 % vzorcev) (**slika 6**).

Na Koroškem so bili vsi analizirani vzorci pozitivni na *S. dysgalactiae*, *E. coli*, *S. uberis*, *T. pyogenes*, *S. marcescens* in kvasovke (100 % prisotnost za vse) (**slika 6**).

V osrednji Sloveniji so bile kvasovke prisotne v 88 % vzorcev, bakterije *S. uberis* pa v 81 % (**slika 6**).

V Podravski regiji so prevladovale bakterije *Enterococcus spp.* in *E. coli*, obojne v 73 % vzorcev (**slika 6**).

Vzorci iz Pomurja so pokazali 100 % prisotnost bakterij *Enterococcus spp.* in *S. uberis* ter kvasovk. Sledile so bakterije *S. aureus* in *S. dysgalactiae* s 75 % (**slika 6**).

V Posavju so bile v vseh vzorcih prisotne kvasovke (100 %), sledile pa so bakterije *Enterococcus spp.*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis* in *T. pyogenes* s 75 % prisotnostjo (**slika 6**).

Vzorci iz Primorsko-notranjske regije so pokazali prisotnost bakterij *C. bovis*, *S. dysgalactiae*, *E. coli*, *S. uberis* in *T. pyogenes* ter kvasovk (**slika 6**).

V Savinjski regiji so bile kvasovke prisotne v 94 % vzorcev, bakterije *S. dysgalactiae* in *S. uberis* pa v 82 % (**slika 6**).

3.4.3. Sklep: Najbolj razširjeni povzročitelji mastitisa po Sloveniji

Na ravni celotne Slovenije so bili najbolj pogosti povzročitelji mastitisa:

- Kvasovke (pojavljale so se v vseh regijah, pogosto s 100 % prisotnostjo)
- *S. uberis* (zelo razširjen povzročitelj, navzoč v skoraj vseh regijah)
- *S. dysgalactiae* (pojavljal se je z visoko frekvenco po večjem delu države)
- *Enterococcus spp.* (pomemben predvsem v vzhodnem delu Slovenije: Podravje, Pomurje, Posavje)
- *E. coli* (pogosta v več regijah, pogosto nad 75 %)
- *T. pyogenes* (redkeje, a dosledno prisotna v določenih regijah)
- *S. aureus* (pomemben predvsem v Pomurju)

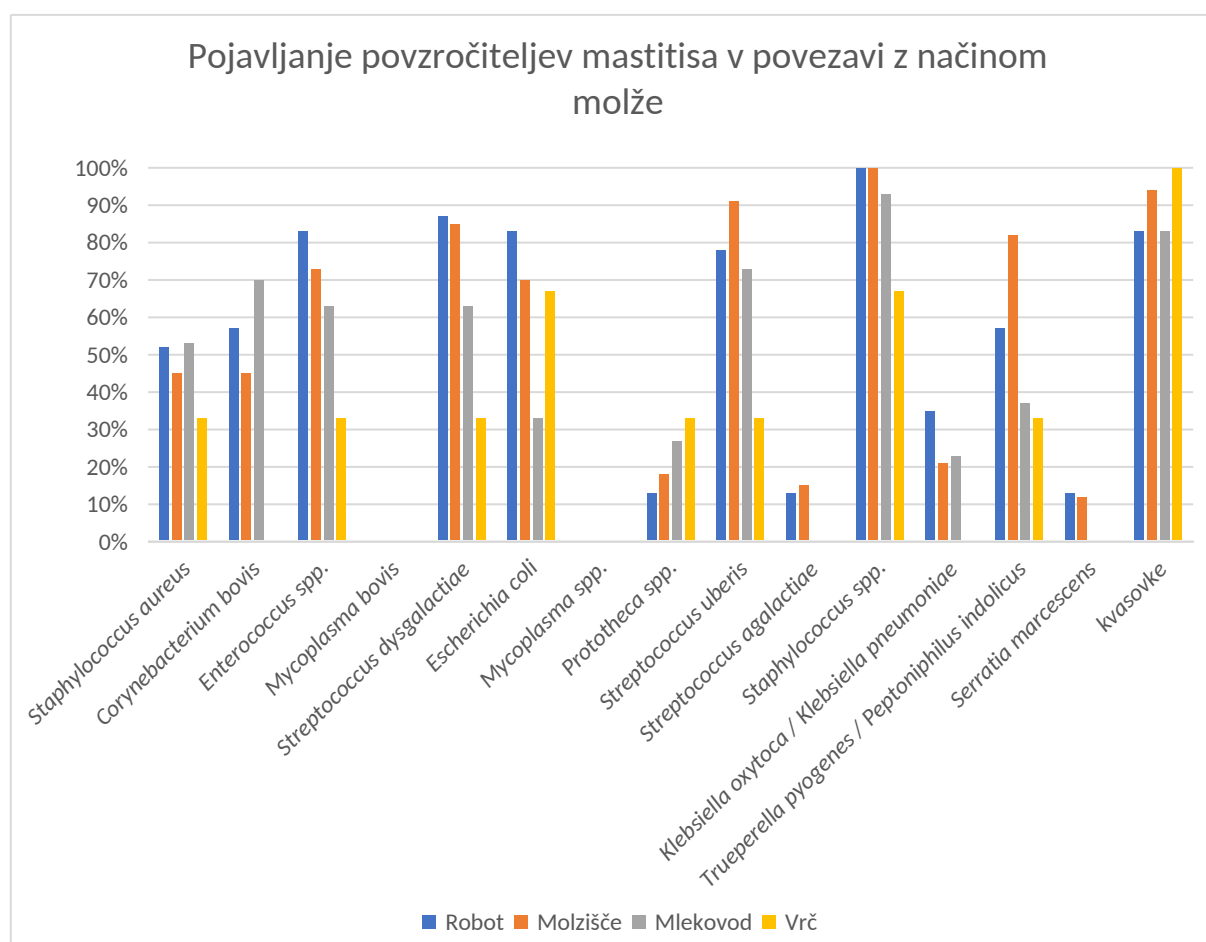
- *K. oxytoca*, *S. marcescens* in *C. bovis* pa so bili prisotni lokalno in redkeje

Skupna ugotovitev kaže, da so bili najbolj razširjeni povzročitelji mastitisa v Sloveniji tisti iz skupine okoljskih povzročiteljev (kvasovke, *S. uberis* in *S. dysgalactiae*), medtem ko se drugi povzročitelji pojavljali bolj regijsko omejeno (**slika 6**).

3.5. POJAVLJANJE POVZROČITELJEV MASTITISA V POVEZAVI Z NAČINOM MOLŽE

Prenos kužnih povzročiteljev mastitisa, med katere uvrščamo bakterije vrste *S. aureus* in *S. agalactiae*, je tesno povezan z načinom molže (Cobirka in sod., 2020).

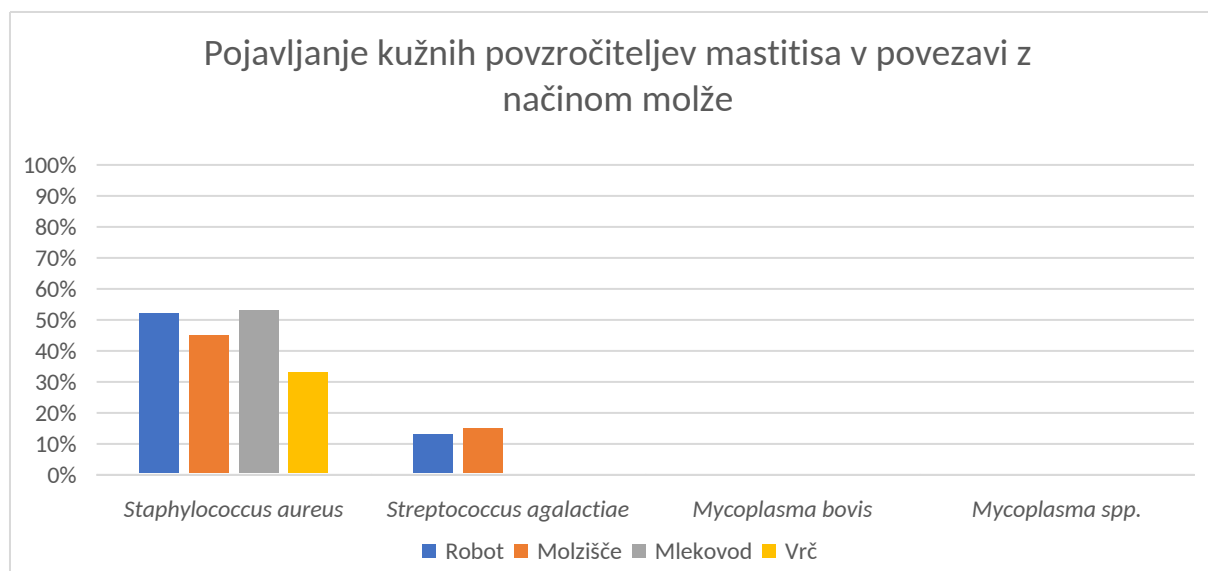
Analiza je pokazala rahlo višjo pojavnost kužnih povzročiteljev na kmetijah, kjer se molža izvaja z molznim robotom ali preko mlekovoda. Pojavnost okoljskih povzročiteljev je bila prav tako nekoliko višja pri molži z robotom ter pri molži na molzišču (**slika 7**). Molže v vrč so se posluževale le tri kmetije (3 %) vključene v analizo, zato je ta skupina zanemarljiva.



Slika 7: Grafični prikaz pojavljanja povzročiteljev mastitisa v povezavi z načinom molže

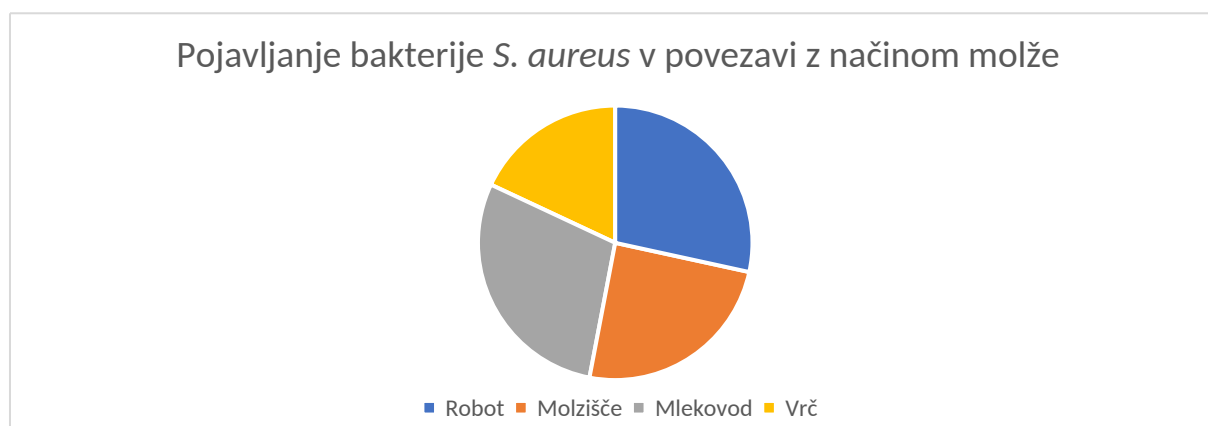
3.5.1. Pojavljanje kužnih povzročiteljev mastitisa v povezavi z načinom molže

Analiza je pokazala, da sta se tako *S. aureus*, kot tudi *S. agalactiae*, najpogosteje pojavljala na kmetijah, ki molžo izvajajo z robotom (*S. aureus* 52 %, *S. agalactiae* 13 %) ali na molzišču (*S. aureus* 45 %, *S. agalactiae* 15 %). *Mycoplasma spp.* ni bila ugotovljena v nobenem vzorcu (**slika 8**).



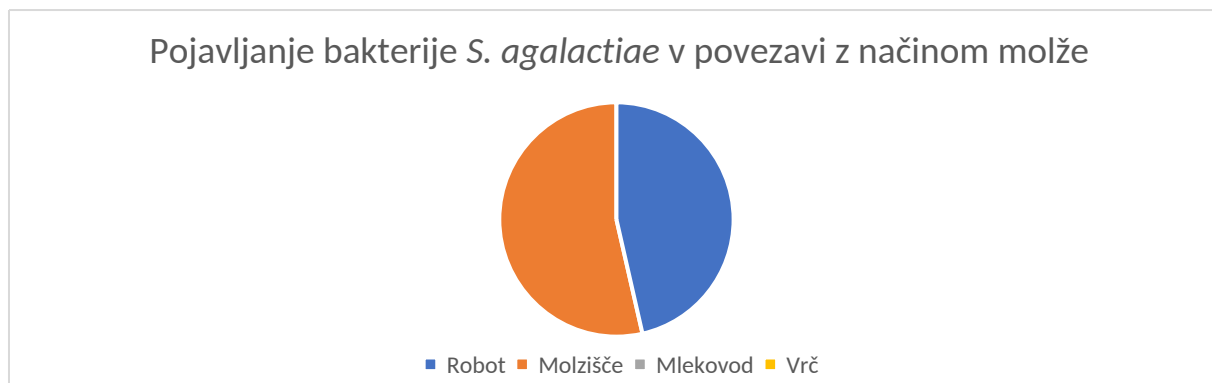
Slika 8: Grafični prikaz pojavljanja kužnih povzročiteljev mastitisa v povezavi z načinom molže

V Sloveniji je bilo med analiziranimi kmetijami 49 % kmetij, kjer je bil v bazenskem vzorcu mleka odkrit *S. aureus* v bazenskem vzorcu mleka. Od tega je bila pojavnost največja na kmetijah, kjer za molžo uporabljajo molzni robot (28 % od vseh pozitivnih vzorcev na *S. aureus*) ali mlekovod (29 % od vseh pozitivnih vzorcev na *S. aureus*) (**slika 9**).



Slika 9: Grafični prikaz pojavljanja bakterije *S. aureus* v povezavi z načinom molže

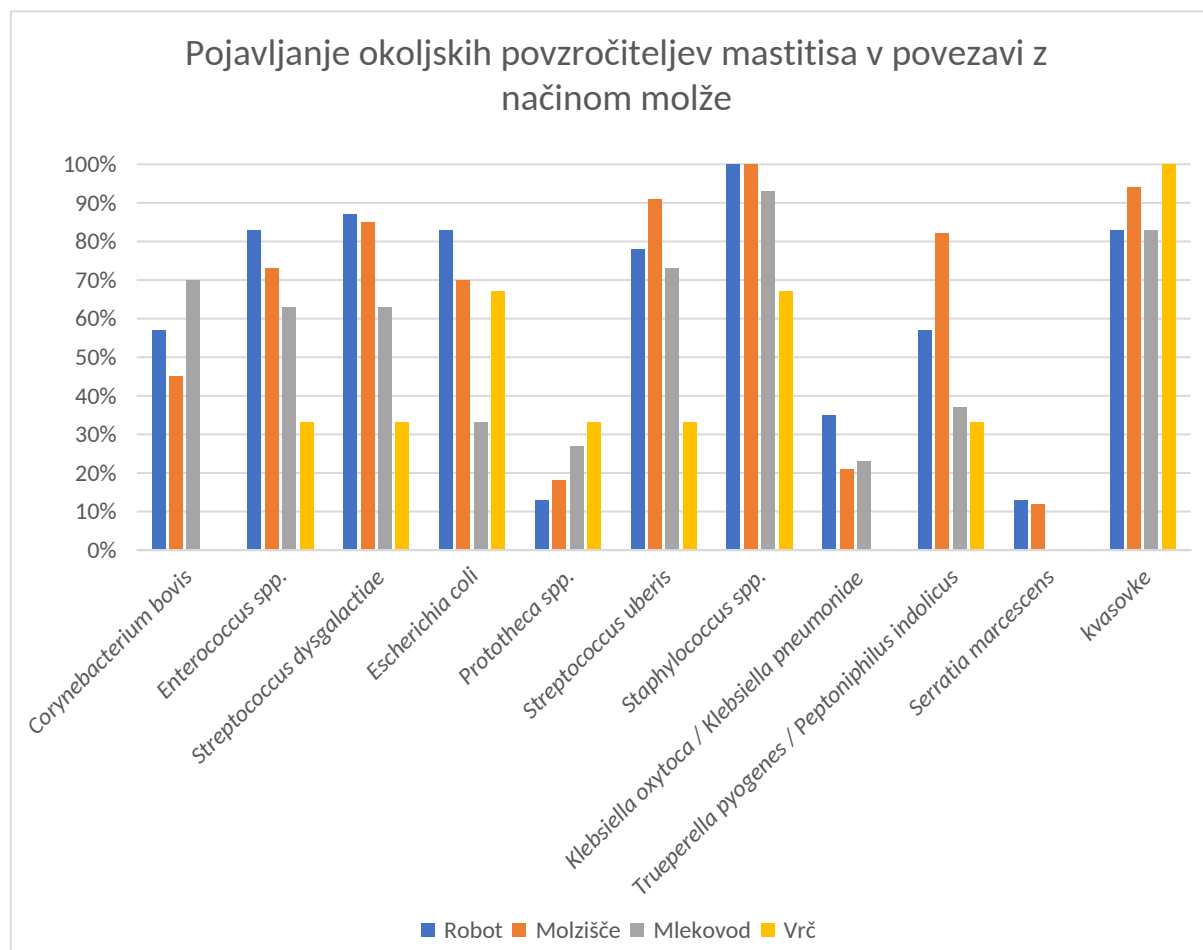
Izmed 9 % vzorcev, pozitivnih na *S. agalactiae*, je bila pojavnost povzročitelja najvišja pri vzorcih iz kmetij, kjer se krave molzejo na molzišču (54 % od vseh pozitivnih vzorcev na *S. agalactiae*) (**slika 10**).



Slika 10: Grafični prikaz pojavljanja bakterije *S. agalactiae* v povezavi z načinom molže

3.5.2. Pojavljanje okoljskih povzročiteljev mastitisa v povezavi z načinom molže

Med večino okoljskih povzročiteljev mastitisa je bilo največ le teh odkritih na kmetijah, kjer so za molžo uporabljali robota (npr. *Enterococcus spp.* 83 % , *S. dysgalactiae* 87 %, *E. coli* 83 % in *K. oxytoca* 35 %) (**slika 11**).



Slika 11: Grafični prikaz pojavljanja okoljskih povzročiteljev mastitisa v povezavi z načinom molže

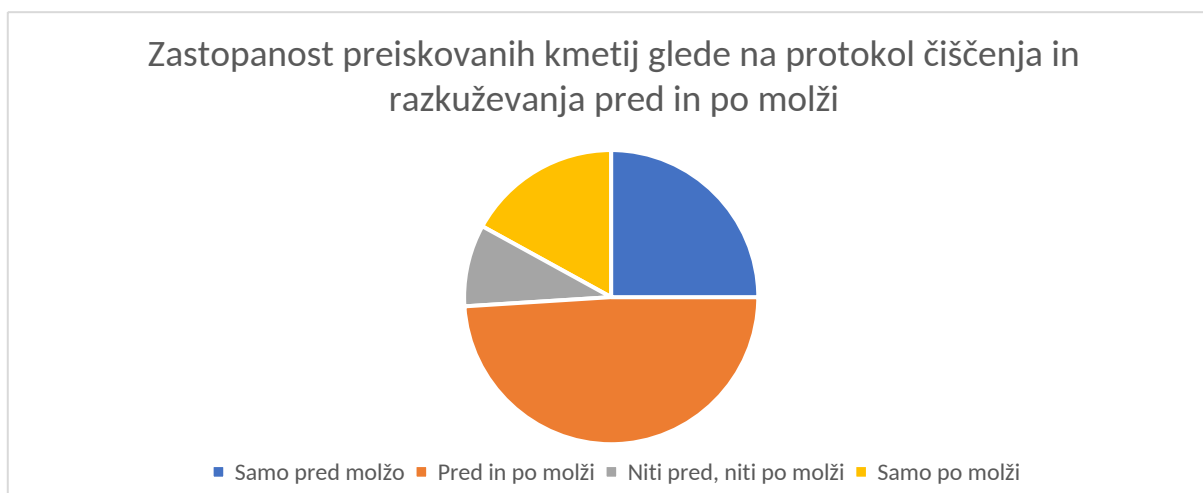
Povzročitelji vrst *T. pyogenes* in *S. uberis* ter kvasovke so bili bolj prisotni na kmetijah z molžo na molzišču (*T. pyogenes* 82 %, *S. uberis* 91 % in kvasovke 94 %) (**slika 11**).

Izstopali so vzorci pozitivni na prisotnost *C. bovis* in *Prototheca spp.*, med katerimi je bila pojavnost največja na kmetijah, kjer za molžo uporabljajo mlekovod (*C. bovis* 70 % in *Prototheca spp.* 27 %) (**slika 11**).

3.6. POJAVLJANJE POVZROČITELJEV MASTITISA V POVEZAVI S PROTOKOLOM ČIŠČENJA IN RAZKUŽEVANJA PRED IN PO MOLŽI

3.6.1. Zastopanost preiskovanih kmetij glede na protokol čiščenja in razkuževanja pred in po molži

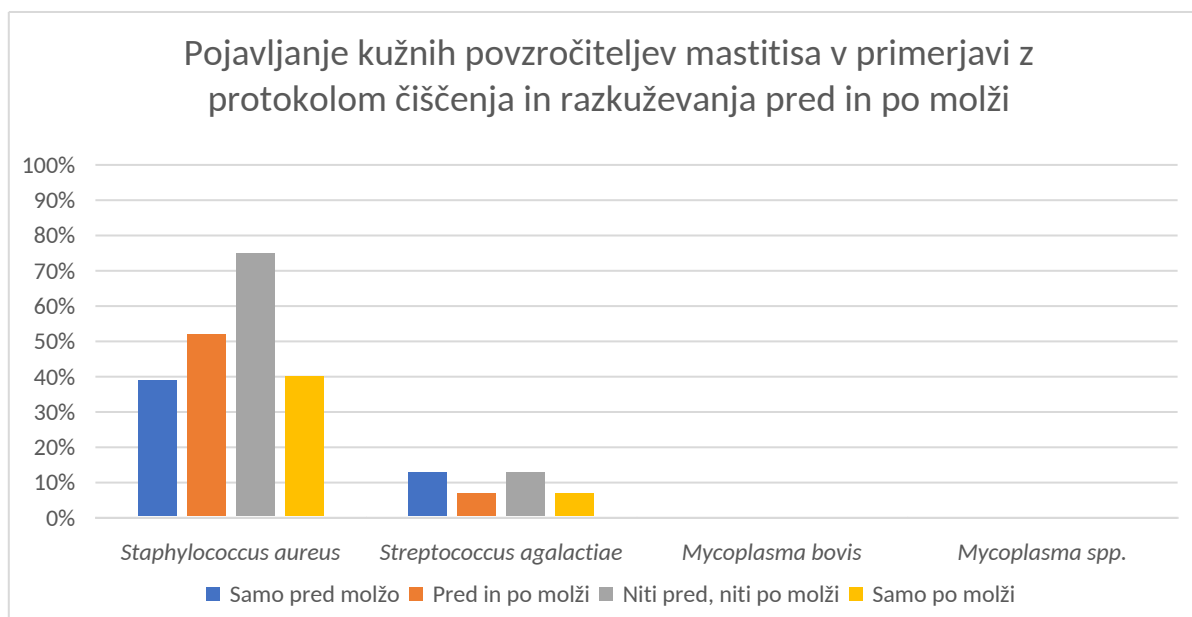
Polovica (49 %) rejcev, ki so sodelovali v raziskavi, opravlja čiščenje in razkuževanje pred in po molži. Nekoliko manjši delež (25 % vseh rejcev) jih opravlja čiščenje in razkuževanje samo pred molžo. Najmanjši delež rejcev pa je označilo, da opravljajo čiščenje in razkuževanje samo po molži (17 % vseh rejcev) ali pa le tega ne opravljajo (9 % vseh rejcev) (**slika 12**). To nakazuje, da so načeloma rejci dobro ozaveščeni o celovitem higienskem protokolu, se zavedajo njegovega pomena in ga tudi uporabljajo v praksi.



Slika 12: Grafični prikaz zastopanosti preiskovanih kmetij glede na protokol čiščenja in razkuževanja pred in po molži

3.6.2. Pojavljanje kužnih povzročiteljev mastitisa v primerjavi s protokolom čiščenja in razkuževanja pred in po molži

Kužni povzročitelji mastitisa so bili v vzorcih mleka najpogosteje prisotni pri rejcih, ki niso izvajali protokola čiščenja in razkuževanja niti pred in niti po molži. Pri 75 % takih kmetij smo v vzorcu bazenskega mleka ugotovili prisotnost *S. aureus* (slika 13).



Slika 13: Grafični prikaz pojavljanja kužnih povzročiteljev mastitisa v primerjavi z protokolom čiščenja in razkuževanja pred in po molži

Pogosta prisotnost teh povzročiteljev je bila zaznana tudi pri rejcih, ki so protokol čiščenja in razkuževanja izvajali samo pred molžo. Pri teh se je *S. aureus* pojavil v 39 % vzorcev, *S. agalactiae* pa v 13 % vzorcih (slika 13). To potrjuje, da je kombinacija predhodnega in naknadnega čiščenja ter razkuževanja najučinkovitejša pri preprečevanju pojavljanja kužnih povzročiteljev v mleku.

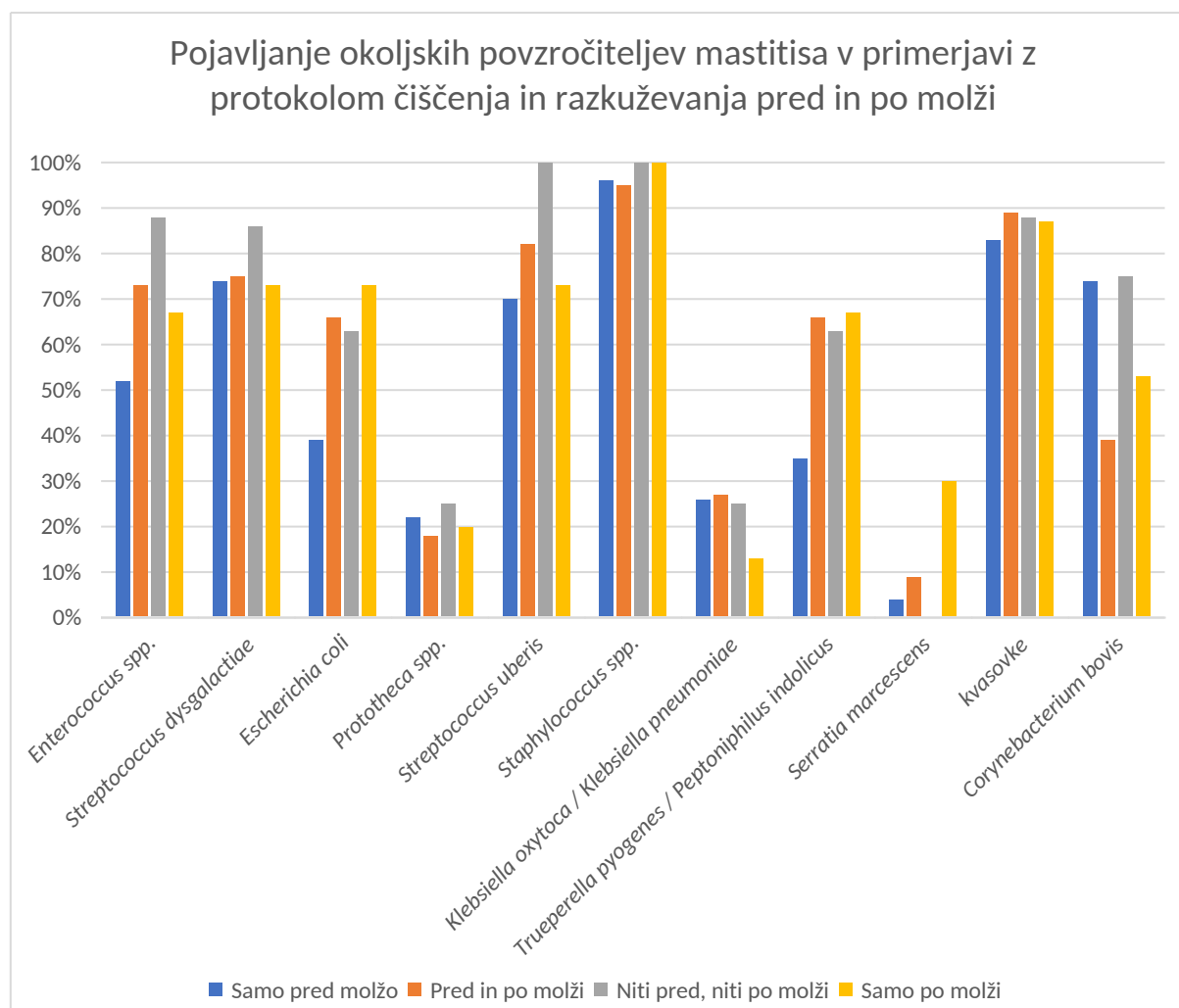
3.6.3. Pojavljanje okoljskih povzročiteljev mastitisa v primerjavi s protokolom čiščenja in razkuževanja pred in po molži

Okoljski povzročitelji so se v vzorcih mleka najpogosteje pojavljali pri rejcih, ki niso izvajali protokolov čiščenja in razkuževanja niti pred, niti po molži. To je najočitneje izraženo pri različnih povzročiteljih iz rodu *Staphylococcus spp.* (100 %), vrste *S. uberis* (100 %), rodu *Enterococcus spp.* (88 %), vrste *S. dysgalactiae* (86 %), vrste *C. bovis* (75 %) in rodu *Prototheca spp.* (25 %) (slika 14).

Več teh povzročiteljev je bilo tudi pri rejcih, ki so čiščenje in razkuževanje izvajali samo po molži. Tu najočitneje izstopajo različni povzročitelji iz rodu *Staphylococcus* (100 %)

ter vrst *E. coli* (73 %), *S. marcescens* (30 %) in delno tudi *T. pyogenes* (67 %) (**slika 14**).

To še dodatno potrjuje ugotovitev iz prejšnjega poglavja »Pojavljanje kužnih povzročiteljev mastitisa v primerjavi s protokolom čiščenja in razkuževanja pred in po molži«, da je dosledno izvajanje protokolov čiščenja in razkuževanja pred in po molži ključnega pomena za preprečevanje pojava tako kužnih, kakor tudi okolijskih povzročiteljev v mleku.



Slika 14: Grafični prikaz pojavljanja okolijskih povzročiteljev mastitisa v primerjavi s protokolom čiščenja in razkuževanja pred in po molži

Pri bakterijah vrste *K. oxytoca*, kvasovkah ter delno tudi pri bakterijah vrste *T. pyogenes* pa se ta značilen vzorec ni pojavljal; pojavljanje teh povzročiteljev je bilo najvišje kljub temu, da so rejci opravljali čiščenje in razkuževanje tako pred kakor tudi po molži (**slika 14**).

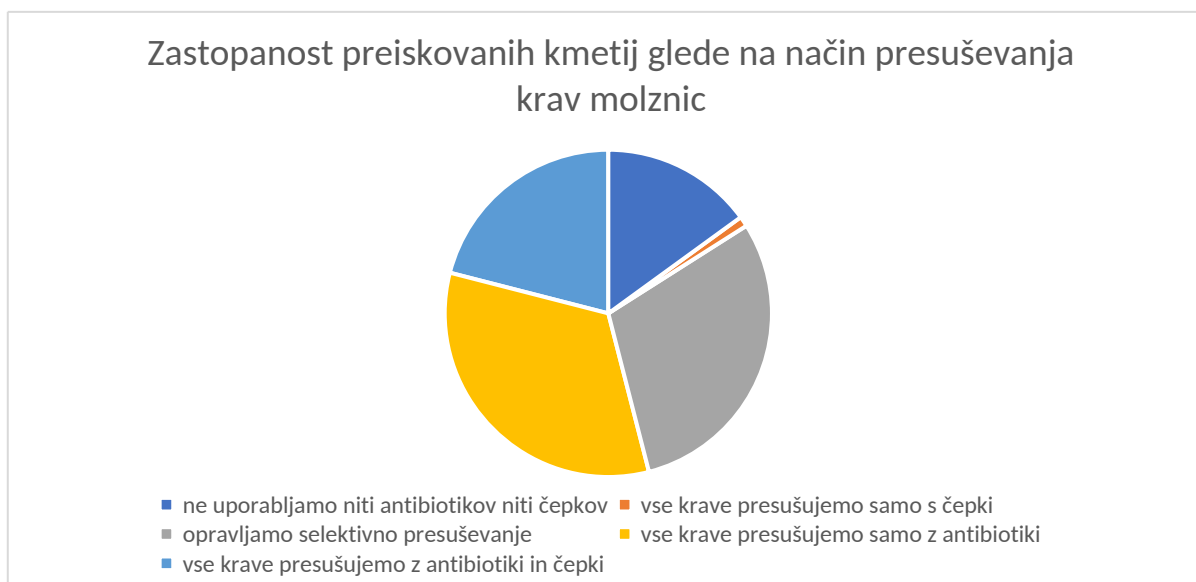
3.7. POJAVLJANJE POVZROČITELJEV MASTITISA GLEDE NA NAČIN PRESUŠEVANJA KRAV MOLZNIC

3.7.1. Zastopanost preiskovanih kmetij glede na način presuševanja krav molznic

Večina rejcev se poslužuje presuševanja vseh krav samo z antibiotiki (33 % vseh rejcev) in selektivnega presuševanja (30 % vseh rejcev) (**slika 15**).

V manjši meri pa se rejci poslužujejo presuševanja z antibiotiki in čepki (21 % vseh rejcev) ali pa pri presuševanju ne uporabljajo niti antibiotikov in niti čepkov (15 % vseh rejcev) (**slika 15**).

Izmed vseh 89 preiskovanih kmetij se le en rejec odloča za presuševanje samo s čepki (1 % vseh rejcev), zato je ta skupina v analizi zanemarljiva (**slika 15**).

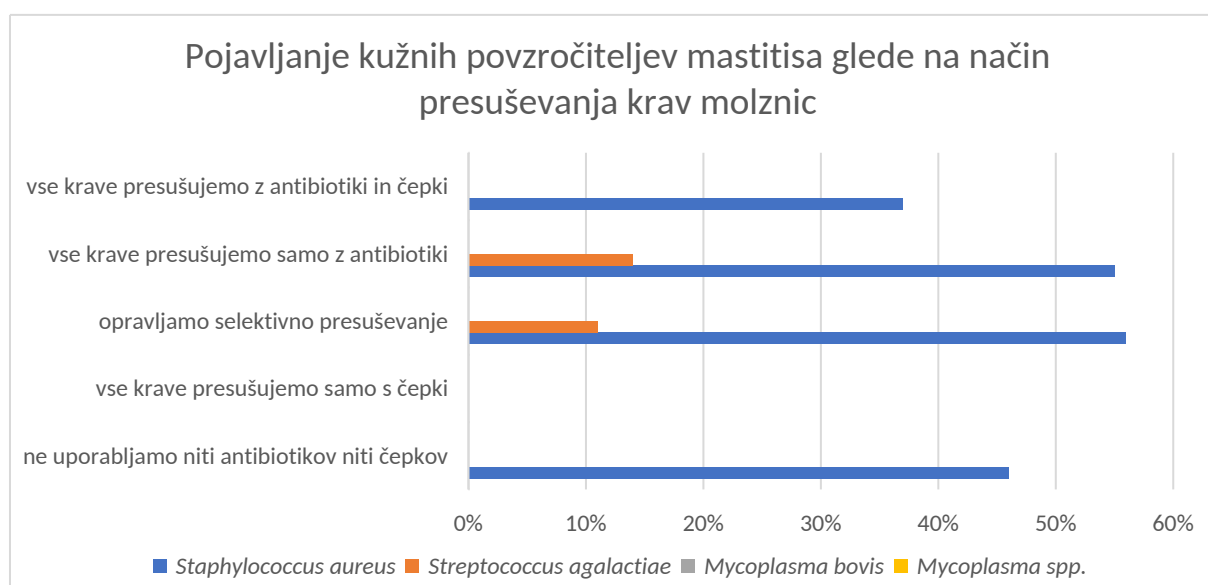


Slika 15: Grafični prikaz zastopanosti preiskovanih kmetij glede na način presuševanja krav molznic

3.7.2. Pojavljanje kužnih povzročiteljev mastitisa glede na način presuševanja krav molznic

Analiza je pokazala, da je bilo v rejah, kjer rejci krave presušujejo z antibiotiki in čepki, v skupnem vzorcu mleka prisotnih najmanj kužnih povzročiteljev. V rejah, kjer rejci opravljajo selektivno presuševanje ali za presuševanje uporabljajo samo antibiotike, ali pa ne uporabljajo niti antibiotikov niti čepkov, je bila pojavnost kužnih povzročiteljev mastitisa višja (**slika 16**).

Presuševanje samo s čepki je uporabljala le ena kmetija, zato je ta način presuševanja v analizi zanemarljiv (**slika 16**).

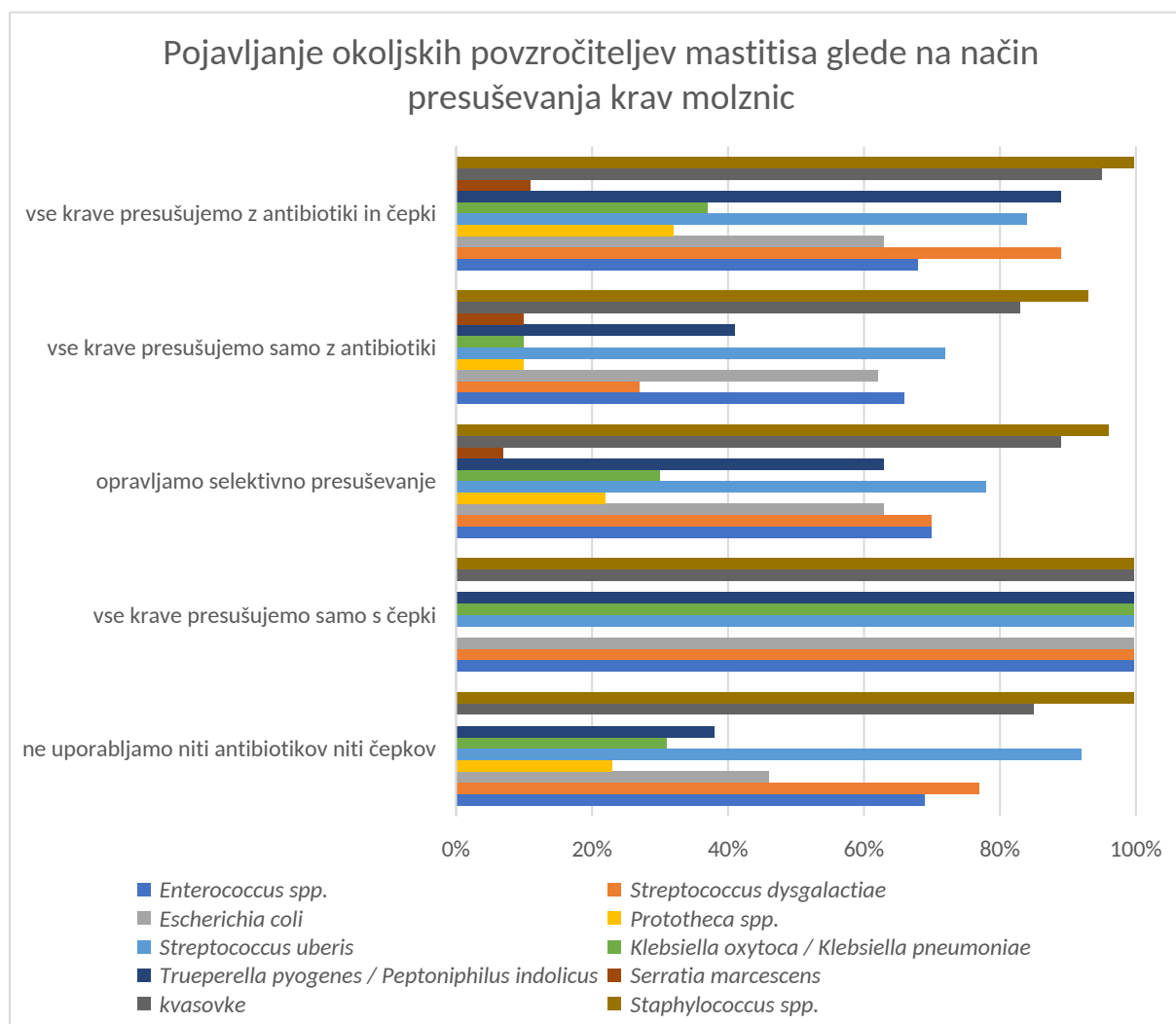


Slika 16: Grafični prikaz pojavljanja kužnih povzročiteljev mastitisa glede na način presuševanja krav molznic

3.7.3. Pojavljanje okoljskih povzročiteljev mastitisa glede na način presuševanja krav molznic

Pojavnost okoljskih povzročiteljev mastitisa je bila le delno manjša pri rejcih, ki vse krave presušujejo z antibiotiki. Drugi načini presuševanja pa niso pokazali vpliva na manjšo pojavnost teh povzročiteljev (**slika 17**).

Presuševanje samo s čepki je uporabljala le ena kmetija, zato je ta način presuševanja v analizi zanemarljiv (**slika 17**).



Slika 17: Grafični prikaz pojavljanja okoljskih povzročiteljev mastitisa glede na način presuševanja krav molznic

3.8. ODPRTA/ZAPRTA ČREDA IN PRISOTNOST KUŽNIH POVZROČITELJEV MASTITISA

3.8.1. Zastopanost preiskovanih kmetij glede na status reje

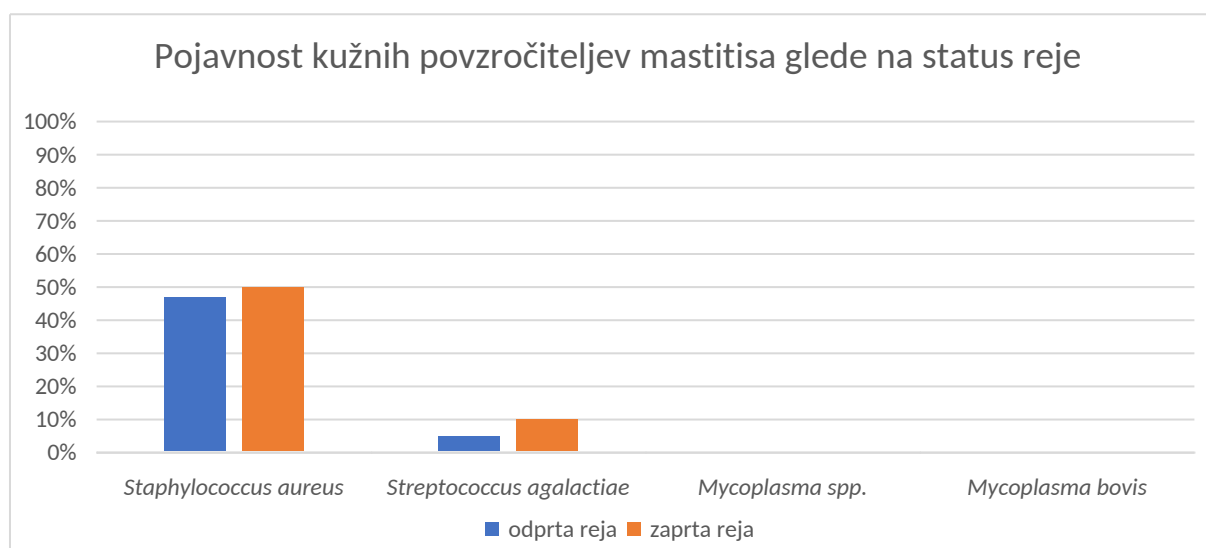
Večina kmetij, vključenih v analizo, ima zaprto rejo (79 %), le manjši del pa odprto rejo (21 %) (slika 18).



Slika 18: Grafični prikaz zastopanosti preiskovanih kmetij glede na status reje

3.8.2. Pojavnost kužnih povzročiteljev mastitisa glede na status reje

Med kužnimi povzročitelji mastitisa, so se bakterije vrste *S. aureus* in *S. agalactiae* pojavljale za malenkost pogosteje v zaprtih kot v odprtih rejah. To je lahko povezano z manjšim izločanjem okuženih živali iz čred, kar pa pripomore k dodatnemu širjenju okužbe znotraj reje (slika 19).

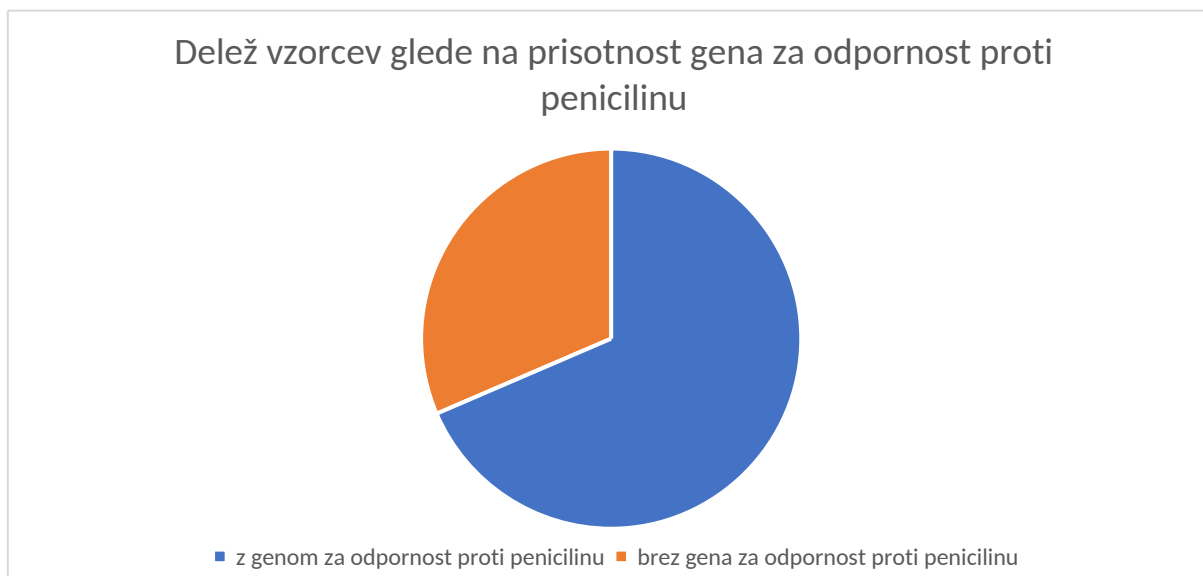


Slika 19: Grafični prikaz pojavnosti kužnih povzročiteljev mastitisa glede na status reje

3.9. POJAVLJANJE GENA ZA ODPORNOST PROTI PENICILINU

3.9.1. Delež vzorcev glede na prisotnost gena za odpornost proti penicilinu

Izmed 89 testiranih vzorcev smo pri kar 61 vzorcih mleka (69 %) ugotovili prisotnost gena za odpornost proti penicilinu (**slika 20**).



Slika 20: Grafični prikaz deleža vzorcev glede na prisotnost gena za odpornost proti penicilinu

4. RAZPRAVA

V nalogi smo analizirali rezultate, ki so bili pridobljeni z metodo qPCR za ugotavljanje prisotnosti petnajstih najpogostejših povzročiteljev mastitisa in enega gena (gen za odpornost proti penicilinu) v bazenskih vzorcih mleka z 89 kmetij ter rezultate iz pripadajočih anketnih vprašalnikov. Glavni namen raziskave je bil ugotoviti pogostost posameznih povzročiteljev mastitisa in gena za odpornost proti penicilinu ter oceniti njihove vzorce pojavljanja glede na rejne prakse, zbrane preko vprašalnika na kmetijah.

Pri interpretaciji rezultatov je treba upoštevati omejitve metode. Metoda qPCR je zelo občutljiva in specifična, vendar zazna tudi DNK mrtvih bakterij, zato lahko v nekaterih primerih pride do zaznave preteklih, že prebolelih okužb. Poleg tega je hlevski vzorec povprečje mleka vseh molznih krav v čredi, zato ne omogoča identifikacije posameznih okuženih živali. Vendar pa je ta pristop zelo uporaben za splošno oceno zdravstvenega stanja črede in za zgodnje odkrivanje širjenja določenih povzročiteljev.

Kljub nekaterim omejitvam je raziskava potrdila, da je qPCR primerna diagnostična metoda za rutinsko spremljanje povzročiteljev mastitisa, hlevski vzorec pa omogoča pregled nad epidemiološkim stanjem na ravni kmetije. Rezultati kažejo, da je za zmanjšanje pojavnosti tako kužnih kot okoljskih povzročiteljev ključno dosledno izvajanje higienskih postopkov pred in po molži, primerno presuševanje ter redno spremljanje stanja z laboratorijskimi testi.

~

Rezultati so pokazali, da so bile najpogostejše ugotovljene bakterije iz rodov *Streptococcus*, *Staphylococcus* in *Enterococcus*, kar je skladno z ugotovitvami iz literature (Bradley, 2002; Bradley in sod., 2007; Pyörälä, 2002).

Najpogostejše je bila prisotna bakterija vrste *S. uberis*, kar potrjuje domnevo, da gre za enega ključnih okoljskih povzročiteljev mastitisa v slovenskih hlevih. Poleg tega pa smo v bazenskih vzorcih mleka ugotovili tudi prisotnost bakterij vrste *S. aureus*, ki je značilen povzročitelj kužnega mastitisa, kar nakazuje na stalno prisotno tveganje za prenos med živalmi znotraj črede. Pogosta prisotnost te bakterije potrjuje, da so okužbe, ki se prenašajo z živali na žival, še vedno pomemben del etiologije mastitisa v slovenskih čredah. *S. aureus* je znan po svoji sposobnosti preživetja v vimenskem tkivu in težavnosti zdravljenja, zato je njegova prisotnost zaskrbljujoča z vidika nadzora nad mastitisom (Jones in sod., 1998).

Okoljski povzročitelji so se pojavljali večkrat kakor kužni, kar lahko nakazuje na težave s higienskimi pogoji v kmetijskem okolju, saj se ti povzročitelji uspešno pomnožujejo npr. v fecesu ali organskem nastilju. Zagotavljanje higiene hlevskega okolja in dobra higiena ob molži je ključna za preprečevanje okoljskih mastitisov (Laven, 2010).

V vzorcih so bile prav tako pogosto prisotne kvasovke, ki so bile zaznane pri večini kmetij, ne glede na vrsto molže, način presuševanja ali higienske ukrepe. To lahko nakazuje na njihovo splošno razširjenost v hlevskem okolju ter njihovo sposobnost preživetja in razmnoževanja v vlažnem mleku ali opremi.

Prisotnost več kot enega povzročitelja v enem vzorcu je bila zabeležena v veliki večini vzorcev, kar poudarja kompleksnost okužb na ravni črede. Metoda qPCR se je tudi pri hlevskem vzorčenju izkazala kot zelo občutljiva za zaznavanje tako posameznih kot mešanih okužb.

Bakterije vrste *T. pyogenes* so pogosto sekundarni povzročitelj mastitisa, ki se običajno pojavi v kombinaciji z drugimi bakterijami, zlasti pri kroničnih mastitisih ali poškodovanih vimenskih četrtih (Wente in sod., 2024).

~

Ugotavljali smo tudi pogostost opravljanja bakterioloških analiz. Le-ta ima namreč veliko pozitivnih učinkov tako za splošno populacijo (zaradi uživanja mleka in mlečnih izdelkov), kakor tudi za rejce mlečnih govedi.

Opravljanje rednih bakterioloških analiz rejcu omogoči zgodnje odkrivanje subkliničnih mastitisov, ki pogosto potekajo brez vidnih simptomov, vendar lahko vodijo do povišanih vrednosti SCC v mleku. Mleko s 300.000 somatskimi celicami/ml ali več, običajno kaže na okužbo z mastitičnimi patogeni, to pa vodi v zmanjšano proizvodnjo in slabšo kakovost mleka. Nižje vrednosti SCC so povezane z boljšim zdravjem živali in višjo kakovostjo mleka (Ganguly, 2017; IRCLASS, 2023; Park in sod., 2007).

Najvišja določena meja za SCC v surovem kravjem mleku v Evropski uniji (EU) je 400.000 somatskih celic/ml. Ta meja je določena v Uredbi (ES) št. 853/2004, ki določa posebna higienska pravila za živila živalskega izvora. V skladu s to uredbo mora biti SCC izračunano kot drseče geometrično povprečje v obdobju treh mesecev, pri čemer mora biti odvzet in analiziran vsaj en vzorec na mesec (UREDBA, 2004).

Z redno opravljenimi bakteriološkimi preiskavami identificiramo specifične patogene, kot so *S. aureus*, *E. coli* in *S. uberis*, to pa nam omogoča ciljno zdravljenje okužb. Vse to zmanjšuje nepotrebno uporabo antibiotikov in tveganje za razvoj odpornosti proti protimikrobnim zdravilom (IRCLASS, 2023; Park in sod., 2007).

Mastitis lahko povzroči znatne gospodarske izgube zaradi zmanjšane proizvodnje mleka, stroškov zdravljenja in morebitnega zavrženja mleka. Redne analize pomagajo pri hitrem ukrepanju in zmanjšanju teh izgub (IRCLASS, 2023).

~

Analiza podatkov iz vprašalnika je pokazala nekaj zanimivih vzorcev. Kužni povzročitelji so se pogosteje pojavljali na kmetijah, kjer se je molža izvajala z molznim

robotom ali ob uporabi mlekovoda, kar je lahko povezano z večjim tveganjem za prenos med živalmi, če oprema ni redno in temeljito razkužena. Tudi okoljski povzročitelji so bili pogostejši pri molži z robotom in na molzišču, kar lahko kaže na to, da je higiena opreme in okolice še posebej pomembna ne glede na tip molže. Pri ročni molži je bila skupna pojavnost patogenov nekoliko nižja, vendar je bil ta sistem prisoten le na manjšem številu kmetij, zato sklepov ne moremo posplošiti.

Mastitis, ki ga povzroča *S. aureus*, predstavlja velik problem v populaciji molznic, saj je zdravljenje med laktacijo večinoma neuspešno. *S. aureus* najpogosteje vodi do kronične ali subklinične oblike mastitisa, ki ni povezan z vidnimi znaki vnetja na vimenu in niti s spremenjenim mlekom, pogosto je edina opazna sprememba povišanje vrednosti SCC pri okuženi kravi. Nekatere krave lahko razvijejo akuten mastitis, še posebej po stresnem obdobju (porod). Prenos povzročitelja iz okuženih na zdrave krave, najpogosteje poteka preko molznih strojev, rok osebja ali krp, uporabljenih za čiščenje seskov. Takšne oblike mastitisa je najučinkoviteje nadzorovati s preventivnimi ukrepi, kot sta preprečevanje novih okužb in izločanje že okuženih živali (Cobirka in sod., 2020; Jones in sod., 1998).

~

S. agalactiae je pomemben povzročitelj kužnega mastitisa, saj je izrazito kužne narave in močno zmanjša kvaliteto mleka. Bakterija raste in se množi v vimenu, vendar lahko kratek čas preživi tudi na rokah, delih molznega stroja in koži vimena. Tako so okužene krave stalen vir okužbe za ostale krave. Najpogosteje se okužbo v čredo zanese z novo nabavljeno okuženo živaljo ali pa z nakupom rabljene molzne opreme. Večina okuženih krav ne kaže vidnih znakov okužbe ali pa so le ti blago izraženi, opazimo pa lahko povišanje SCC in zmanjšano produkcijo mleka. V primeru odkritih okužb, je le te potrebno zdraviti z ustreznim antibiotikom. Za preprečevanje širjenja okužbe je priporočljivo, da rejci med molžo nosijo rokavice, opravljajo učinkovito higieno priprave vimena na molžo ter ustrezno razkuževanje po molži, ustrezno vzdrževanje in čiščenje molzne opreme in redno preverjanje mleka - predvsem pri novo nabavljenih živalih preden jih vključijo v čredo (Cornell University, 2016; Keefe, 1997)

C. bovis naseljuje seskov kanalček, ki skupaj z vnetim vimenom služita kot rezervoar bakterije za širjenje okužbe. Krava z mastitisom, povzročenim s *C. bovis*, pogosto ne kaže kliničnih znakov. Edina znaka mastitisa sta povišanje SCC in rahlo znižana produkcija mleka, zato je pomembno spremljanje SCC. Za uspešno preprečevanje okužb s tem povzročiteljem je pomembna ustrezna higiena molže in uporaba učinkovitih razkužil po molži. Zdravljenje mastitisa, povzročenega s *C. bovis*, je najučinkovitejše med presušitvijo, tekom laktacije pa ni priporočljivo (Gonçalves in sod., 2016; Lücken in sod., 2022; Swartz & Petersson-Wolfe, 2016).

Najučinkovitejša preventiva mastitisov, ki jih povzročajo kužni povzročitelji, je dobra higiena med molžo ter ustrezna higiena osebja, prisotnega pri molži. Z ustrezno

nastavitvijo pulzacije in vakuma, rednim vzdrževanjem gumic na tulcih molznega stroja ter preprečevanjem molže v prazno, zmanjšamo poškodbe seskov in mišice zapiralke (Jones in sod., 1998).

Higieno med molžo zagotavljamo tudi z uporabo čistih rok ali rokavic pri rokovanju z vimenom. Klinične primere mastitisa je treba ustrezno zdraviti, medtem ko je subklinične mastitise najlažje zdraviti ob presušitvi krave. Pomembno vlogo ima tudi zgodnje odkrivanje in zdravljenje kroničnih mastitisov – takšne krave lahko prezgodaj presušimo ali pa v primeru slabega odziva na zdravljenje presušimo prizadeto četrto. Vse okužene krave je potrebno ločiti od ostalih in jih molsti zadnje (Jones in sod., 1998).

~

Pomembna razlika med skupinami kmetij se je pokazala tudi pri higienskih postopkih. Na kmetijah, kjer niso izvajali čiščenja in razkuževanja pred in po molži, je bila večja prisotnost kužnih povzročiteljev. Tudi okolijski povzročitelji so bili nekoliko pogostejši pri pomanjkljivem razkuževanju, zlasti tam, kjer so izvajali razkuževanje samo po molži, vendar ta vzorec ni bil izrazit pri vseh patogenih. Na primer pri bakterijah iz rodu *Klebsiella* in vrste *T. pyogenes* nismo zaznali značilne povezave s posameznimi higienskimi postopki, kar kaže na to, da so poti prenosa za nekatere povzročitelje bolj kompleksne.

Pogosto pojavljanje *K. oxytoca* in *T. pyogenes* kljub čiščenju in razkuževanju pred in po molži, lahko nakazuje na prisotnost biofilmov v notranjosti molzne opreme. Biofilmi so kompleksne mikrobne skupnosti, obdane z zaščitno matrico, ki se pritrujejo na notranje površine mlekovodov. Neustrezen protokol čiščenja in razkuževanja, predvsem povezan z neustrezno temperaturo, neustreznimi čistili ali neustreznim pretokom vode med čiščenjem, lahko vodi do pojava ostankov mleka na površini. Ti ostanki lahko pripomorejo k pritrditvi različnih mikroorganizmov, jim ustvarijo optimalne pogoje za kolonizacijo in tvorbo biofilmov. Mikroorganizmi iz biofilmov, ki so lahko ene vrste ali kompleks več vrst, lahko med molžo potujejo po ceveh in tako pripomorejo k dolgotrajni prisotnosti teh bakterij v skupnem vzorcu mleka. Lahko pa se pojavijo tudi v kolostrumu, ki ga rejci nato hranijo teletom in jih s tem izpostavijo raznim patogenim povzročiteljem (Desmousseaux in sod., 2025; Hebishy in sod., 2024; Latorre in sod., 2022).

Čiščenje mlekovodov lahko predstavlja izziv za rejce, saj so notranje površine mlekovodov pogosto težko dostopne za ročno čiščenje, zato se pogosto zanašajo na avtomatske sistem čiščenja, ki pa morda ne dosežejo vseh delov sistema. Ko se biofilmi formirajo, jih je težko odstraniti, saj so odporni na standardne postopke čiščenja in razkuževanja. Tako se lahko razni patogeni mikroorganizmi, kot so bakterije iz rodu *Klebsiella*, pritrdijo in se razmnožujejo, kljub rednemu čiščenju opreme (Desmousseaux in sod., 2025; Hebishy in sod., 2024).

~

V raziskavi smo preverjali tudi vpliv načina presuševanja krav molznic na pojavnost najpogostejših povzročiteljev mastitisa. Ugotovili smo, da je bilo najmanj kužnih povzročiteljev zaznanih na kmetijah, kjer so ob presuševanju uporabljali tako antibiotike kot čepke, kar potrjuje učinkovitost kombinirane preventive pri zapiranju vimena. Okoljski povzročitelji so bili sicer prisotni tudi v teh primerih, vendar se je pri uporabi antibiotikov pojavnost deloma zmanjšala. Pri uporabi samo čepkov ali nobenega sredstva so bile okužbe pogostejše.

Z vidika preprečevanja okužb je najboljša uporaba tako antibiotikov kot tudi čepkov med presušitvijo. Presuševanje z antibiotiki je sicer dobro, saj tako pozdravimo morebitno okužbo krave, tudi če ta še nima izraženih kliničnih znakov oziroma bolezen poteka subklinično, vendar pa se presuševanje z antibiotiki odsvetuje. Konstantno presuševanje krav, ki niso okužene, lahko vodi v naraščanje mikrobne odpornosti bakterij v črevesju, vimenu in okolju. Odporne bakterije se nato lahko prenašajo med živalmi in tudi na ljudi, torej tako dolgoročno ogrožamo učinkovitost zdravljenja bakterijskih okužb ne le pri živalih, temveč tudi pri ljudeh. Prav tako je uporaba antibiotikov v preventivne namene brez utemeljitve v EU prepovedana (Uredba (EU) št. 2019/6, člen 107) (Gonçalves in sod., 2016b; UREDBA, 2019).

Z vidika preprečevanja mikrobne odpornosti, je zato bolje uporabiti selektivno presuševanje, kjer z antibiotiki presušujemo le tiste krave, za katere ocenimo, da so v nevarnosti za pojav mastitisa med presušitvenim obdobjem (Okello in sod., 2023).

Presuševanje s čepki naj bi pomagalo pri preprečevanju okužbe z okoljskimi povzročitelji mastitisa, ki v vime vdrejo skozi seskovo odprtino. S čepkom zapremo odprtino seska, zato čepek deluje kot fizična pregrada, ki prepreči vstop okoljskim povzročiteljem. Ti se zadržujejo v nastilju, gnoju, na paši in drugje v okolju ter na koži krav. Nekateri od okoljskih povzročiteljev (npr. *E. coli* in *S. uberis*) lahko v okolju preživijo tudi mesece v ustreznih pogojih. Določen nastilj, kot na primer mivka, ne podpira rasti teh bakterij, zato je v hlevih kjer imajo težave z mastitisi povzročenimi z okoljskimi povzročitelji, priporočljiv tak nastilj (Laven, 2010; Okello in sod., 2023).

~

Odpornost proti antibiotikom predstavlja resno tveganje tako za zdravje živali kot tudi za javno zdravje. Genetski elementi za odpornost, kot je gen za odpornost proti penicilinu, se lahko prenašajo med bakterijami in potencialno v človeško črevesno mikrobioto prek surovega mleka. Horizontalni prenos genov med bakterijami v prebavnem traktu lahko vodi do pojava odpornih patogenov tudi pri ljudeh, zlasti pri ranljivih skupinah (otroci, imunsko oslabei) (Sommer in sod., 2024).

5. SKLEPI

- V raziskavi smo s pomočjo metode qPCR analizirali prisotnost 15 povzročiteljev mastitisa v hlevskih vzorcih mleka z 89 slovenskih kmetij.
- Najpogostejše prisoten kužni povzročitelj v Sloveniji je bil *S. aureus*, kar potrjuje njegovo prisotnost v številnih čredah in kaže na stalno tveganje za okužbe.
- Med okoljskimi povzročitelji je bila najpogostejše zaznana bakterija vrste *S. uberis*, ki velja za enega najpomembnejših okoljskih patogenov mastitisa.
- Kvasovke so bile prisotne v večini vzorcev, neodvisno od rejnih praks, kar nakazuje na njihovo široko razširjenost v hlevskem okolju.
- Kužni povzročitelji so se pogosteje pojavljali na kmetijah, kjer so uporabljali molzni robot ali mlekovod, kar je lahko povezano z lažjim prenosom okužbe med živalmi ob pomanjkljivi higieni opreme.
- Okoljski povzročitelji so se prav tako pogosteje pojavljali pri molži z robotom ali v molzišču, kar kaže na pomembnost rednega čiščenja molznih sistemov in higiene ležišč.
- Kužni povzročitelji so bili izraziteje prisotni na kmetijah, kjer pred in po molži ni bilo izvedeno ne čiščenje ne razkuževanje vimena.
- Povečan delež okoljskih povzročiteljev smo opazili tudi na kmetijah, kjer so razkuževali samo po molži, čeprav pri nekaterih povzročiteljih (npr. *Klebsiella spp.*, *T. pyogenes*) značilnega vzorca ni bilo zaznati.
- Najmanj kužnih povzročiteljev je bilo zaznanih na kmetijah, ki so pri presuševanju uporabljale kombinacijo antibiotikov in čepkov, kar potrjuje učinkovitost te zaščitne strategije.
- Prisotnost okoljskih povzročiteljev je bila nekoliko manjša tudi pri uporabi antibiotikov ob presuševanju, medtem ko so se pri uporabi samo čepkov ali nobenega sredstva okužbe pojavljale pogosteje.
- Metoda qPCR se je izkazala kot hitro, občutljivo in zanesljivo diagnostično orodje za analizo povzročiteljev mastitisa na ravni črede.
- Hlevski vzorec je primeren za oceno splošnega zdravstvenega stanja v čredi, vendar ne omogoča identifikacije posameznih okuženih živali.
- Rezultati poudarjajo pomembnost dobrih higienskih praks pred in po molži, ustreznega presuševanja ter rednega spremljanja stanja s pomočjo laboratorijskih metod za učinkovito obvladovanje mastitisa v čredi.

6. ZAHVALE

Najlepše se zahvaljujem mentorici, asist. dr. Majdi Golob, in somentorici, znan. sod. dr. Darji Kušar, z Enote za bakteriologijo in mikologijo IMP-VF, za dano priložnost, strokovno vodenje, deljenje znanja ter za vso podporo, pomoč in potrpežljivost med delom.

Iskrena hvala vsem veterinarjem, ki so priporočili reje za sodelovanje v projektu in sodelovali pri odvzemu vzorcev, ter rejcem, ki so si vzeli čas za izpolnitev vprašalnika in prispevali k izvedbi raziskave. Zahvaljujem se tudi podjetju Animalis d.o.o. za pomoč pri zbiranju vzorcev in sodelovanje v projektu.

Posebna zahvala gre mojim kolegicam za vzpodbudo, pogovore in pomoč pri iskanju ravnotežja med študijem in vsakdanom.

Iskrena hvala tudi mojemu partnerju Patriku za spodbudne besede in neomajno vero, da zmorem vse, česar se lotim.

Zahvaljujem se tudi svoji družini za materialno podporo, ki mi je omogočila študij in pripravo te naloge.

7. LITERATURA IN VIRI

- Bradley, A. J. (2002). Bovine Mastitis: An Evolving Disease. *The Veterinary Journal*, 164(2), 116–128. <https://doi.org/10.1053/tvjl.2002.0724>
- Bradley, A. J., Leach, K. A., Breen, J. E., Green, L. E., & Green, M. J. (2007). Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *Veterinary Record*, 160(8), 253–258. <https://doi.org/10.1136/vr.160.8.253>
- Cargill. (2021). Mastitis in Cows: Causes, Symptoms, Prevention and Treatment. *Cargill India*. <https://www.cargill.co.in/en/mastitis-in-cows-causes,-symptoms,-prevention-and-treatment>
- Cheng, W. N., & Han, S. G. (2020). Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments — A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 33(11), 1699–1713. <https://doi.org/10.5713/ajas.20.0156>
- Cobirka, M., Tancin, V., & Slama, P. (2020). Epidemiology and Classification of Mastitis. *Animals*, 10(12), 2212. <https://doi.org/10.3390/ani10122212>
- Couture, V., Pighetti, G., Krawczel, P., & Eckelkamp, L. (2019). *Managing Mastitis in Heifers and Dry Cows*. <https://utia.tennessee.edu/publications/wp-content/uploads/sites/269/2023/10/W813.pdf>
- Desmousseaux, C., Guilbaud, M., Jard, G., Tormo, H., Oulahal, N., Hanin, A., Bourdonnais, E., Jha, P. K., & Laithier, C. (2025). Biofilms in the milking machine, from laboratory scale to on-farm results. *Journal of Dairy Science*. <https://doi.org/10.3168/jds.2024-25352>
- Ganguly, S. (2017). Bacteriological Testing of Milk Samples Suspected of Sub-Clinical Mastitis: A Case Study . *International Journal of Research Studies in Microbiology and Biotechnology (IJRSMB)*, 3(1), 12–14.
- Golob, M., Šavli, T., Hrovatin, H., Kavalič, M., Zajc, U., Zdovc, I., Papić, B., Avberšek, J., Pengov, A., & Kušar, D. (2025). Hitra diagnostika povzročiteljev mastitisa pri govedu: analiza rezultatov metode qPCR za bazenske vzorce mleka iz slovenskih kmetij. *Veterinarski Vestnik*.
- Gonçalves, J. L., Tomazi, T., Barreiro, J. R., Beuron, D. C., Arcari, M. A., Lee, S. H. I., Araújo Junior, J. P., & Santos, M. V. dos. (2016). Effects of bovine subclinical mastitis caused by *Corynebacterium* spp. on somatic cell count, milk yield and composition by comparing contralateral quarters. *The Veterinary Journal*, 209, 87–92. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.08.009>
- Hebishy, E., Yerlikaya, O., Reen, F. J., Mahony, J., Akpınar, A., Saygili, D., & Datta, N. (2024). Microbiological aspects and challenges of dairy powders – II: Biofilm/biofouling. *International Journal of Dairy Technology*, 77(3), 691–712.

<https://doi.org/10.1111/1471-0307.13076>

- IRCLASS. (2023). Enhancing Food Safety: The Significance of Six-monthly Mandatory FSSAI Testing at Notified Laboratories. *IRClass*. <https://isspllab.com/enhancing-food-safety-the-significance-of-six-monthly-mandatory-fssai-testing-at-notified-laboratories/>
- Jayarao, B. M., & Wolfgang, D. R. (2003). Bulk-tank milk analysis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 19(1), 75–92. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(02\)00075-0](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(02)00075-0)
- Jones, G. M., Bailey, T. L., & Roberson, J. R. (1998). Staphylococcus Aureus Mastitis: Cause, Detection, and Control. *The Cattle Site*. <https://www.thecattlesite.com/articles/679/staphylococcus-aureus-mastitis-cause-detection-and-control>
- Keefe, G. P. (1997). Streptococcus agalactiae mastitis: a review. *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne*, 38(7), 429–437. https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1576741/?utm_source=chatgpt.com
- Latorre, A. A., Oliva, R., Pugin, J., Estay, A., Nualart, F., Salazar, K., Garrido, N., & Muñoz, M. A. (2022). Biofilms in hoses utilized to divert colostrum and milk on dairy farms: A report exploring their potential role in herd health, milk quality, and public health. *Frontiers in Veterinary Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.969455>
- Laven, R. (2010). Environmental Mastitis. *NADIS*. https://www.nadis.org.uk/disease-a-z/cattle/mastitis/mastitis-part-10-environmental-mastitis/?utm_source=chatgpt.com
- Lücken, A., Woudstra, S., Wente, N., Zhang, Y., & Krömker, V. (2022). Intramammary infections with *Corynebacterium* spp. in bovine lactating udder quarters. *PLOS ONE*, 17(7), e0270867. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0270867>
- Okello, E., ElAshmawy, W. R., Williams, D. R., Lehenbauer, T. W., & Aly, S. S. (2023). Effect of dry cow therapy on antimicrobial resistance of mastitis pathogens post-calving. *Frontiers in Veterinary Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1132810>
- Park, Y. K., Koo, H. C., Kim, S. H., Hwang, S. Y., Jung, W. K., Kim, J. M., Shin, S., Kim, R. T., & Park, Y. H. (2007). The Analysis of Milk Components and Pathogenic Bacteria Isolated from Bovine Raw Milk in Korea. *Journal of Dairy Science*, 90(12), 5405–5414. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0282>
- Pyörälä, S. (2002). New Strategies to Prevent Mastitis. *Reproduction in Domestic Animals*, 37(4), 211–216. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2002.00378.x>
- SiStat. (2020). *Kmetijska gospodarstva po velikostnih razredih števila govedi, Slovenija, večletno*. Republika Slovenija, Statistični Urad.

- Sommer, A. J., Kettner, J. E., & Coon, K. L. (2024). Stable flies are bona fide carriers of mastitis-associated bacteria. *MSphere*, 9(7). <https://doi.org/10.1128/msphere.00336-24>
- Cornell University. (2016). *Streptococcus agalactiae*. *College of Veterinary Medicine*. https://www.vet.cornell.edu/animal-health-diagnostic-center/testing/testing-protocols-interpretations/streptococcus-agalactiae-strep-ag?utm_source=chatgpt.com
- Swartz, T., & Petersson-Wolfe, C. S. (2016). *Corynebacterium bovis*: A Practical Summary for Controlling Mastitis. *Virginia Cooperative Extension*.
- Tommasoni, C., Fiore, E., Lisuzzo, A., & Giancesella, M. (2023). Mastitis in Dairy Cattle: On-Farm Diagnostics and Future Perspectives. *Animals*, 13(15), 2538. <https://doi.org/10.3390/ani13152538>
- UREDBA. (2004). *UREDBA (ES) št. 853/2004 EVROPSKEGA PARLAMENTA IN SVETA*.
- UREDBA. (2019). *Uredba (EU) 2019/6 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 11. decembra 2018 o zdravilih za uporabo v veterinarski medicini in razveljavitvi Direktive 2001/82/ES (Besedilo velja za EGP)*. <http://data.europa.eu/eli/reg/2019/6/oj>
- Wente, N., Leimbach, S., Woudstra, S., & Krömker, V. (2024). Trueperella Pyogenes—Strain Diversity and Occurrence in Dairy Herds. *Pathogens*, 13(7), 534. <https://doi.org/10.3390/pathogens13070534>
- Wieland, M. (2024). Mastitis in Cattle. *MSD Veterinary Manual*. <https://www.msdsvetmanual.com/reproductive-system/mastitis-in-large-animals/mastitis-in-cattle>

8. PRILOGE

PRILOGA 1: VPRAŠALNIK ZA REJCE »SUROVO MLEKO KOT POTENCIALNI VIR VEČKRATNO ODPORNIH BAKTERIJ IN GENOV ZA ODPORNOST«

1. Kakšni so vaši razlogi za prirejo mleka?

- ☐ glavni vir dohodka
- ☐ dodatni vir dohodka
- ☐ samooskrba (večinoma ni dodatnega zaslužka)
- ☐ (drugo: _____)

2. Koliko ljudi skrbi za živali na kmetiji?

So to večinoma družinski člani ali zaposleni (obkrožite)?

3. Način reje?

- ☐ vezana reja
- ☐ prosta reja (stalno v hlevu)
- ☐ prosta reja – paša tudi zunaj

4. Nastilj?

- ☐ slama
- ☐ seno
- ☐ guma
- ☐ globok nastilj:
- ☐ drugo (_____)

5. Kako pogosto odstranjujete gnoj iz hleva?

- ☐ 2x dnevno
- ☐ 1x dnevno
- ☐  tedensko
- ☐ _____
- (drugo: _____)

6. So živali v hlevu ločene glede na status/starost (krave v laktaciji, krave v presuševanju, teleta)?

- ☐ da
- ☐ ne

7. Ali imate zaprto rejo ali živali dokupujete?

- ☐ zaprta reja
- ☐ dokupovanje živali

8. Pasma krav?

9. Število krav molznic na kmetiji + ocena dnevne proizvodnje mleka?

10. Način molže?

- "" strojna - molzišče
- "" strojna - robot
- "" strojna - mlekovod

11. Kdaj čistite prostor, kjer poteka molža?

- "" po vsaki molži
- "" enkrat tedensko
- "" po potrebi

12. Kako čistite prostor, kjer poteka molža?

- "" s hladno vodo
- "" z vročo vodo
- "" z detergentom
- "" z dezinfekcijskim sredstvom
- "" (drugo: _____)

13. Ali opravljate čiščenje in razkuževanje vimena pred molžo in razkuževanje po molži?

- "" opravljam samo čiščenje vimena pred molžo
- "" opravljam samo razkuževanje vimena po molži
- "" opravljam čiščenje in razkuževanje vimena pred molžo + razkuževanje po molži
- "" ne opravljam niti čiščenja in razkuževanja vimena pred molžo niti razkuževanja po molži

14. Koliko somatskih celic v vzorcu bazenskega mleka imate ta mesec?

- "" < 150.000 celic/ml
- "" 150.000–250.000 celic/ml
- "" 250.000–350.000 celic/ml
- "" > 350.000 celic/ml

15. Kaj naredite z mlekom od krav, ki imajo povečano število somatskih celic v mleku?

16. Ali opravljate bakteriološke analize mleka v primeru povečanega števila somatskih celic?

- ☐ ne
- ☐ manj kot enkrat letno
- ☐ več kot enkrat letno
- ☐ pred presušitvijo

17. Kaj uporabljate za presuševanje krav?

- ☐ vse krave presušujemo **z antibiotiki in čepki**
- ☐ vse krave presušujemo **samo z antibiotiki**
- ☐ vse krave presušujemo **samo s čepki**
- ☐ opravljamo **selektivno** presuševanje
- ☐ ne uporabljamo niti antibiotikov niti čepkov

18. Koliko imate primerov kliničnega mastitisa na mesec?

19. Kakšen protokol imate za zdravljenje mastitisa (koliko časa traja terapija, katere antibiotike uporabljate)?

- ☐ penicilin
- ☐ kloksacilin
- ☐ amoksisicilin
- ☐ amoksisicilin s klavulansko kislino
- ☐ cefaleksin + kanamicin
- ☐ cefkvinom / cefalosporini 3. generacije
- ☐ streptomycin
- ☐ tetraciklini
- ☐ linkomicin + neomicin
- ☐

(drugo: _____)

20. Ali vam poleg mastitisa še kaj drugega predstavlja zdravstveni problem na kmetiji (driske...) in katere antibiotike uporabljate v teh primerih?
