

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

BRNO 2015

Bc. MARIE POLÁČKOVÁ

Mendelova univerzita v Brně

Agronomická fakulta

Ústav technologie potravin



**Možnosti detekce mastitidního mléka ve vztahu k jeho
technologické kvalitě**

Diplomová práce

Vedoucí práce:

prof. Ing. Květoslava Šustová, Ph.D.

Vypracovala:

Bc. Marie Poláčková

Brno 2015

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: Možnosti detekce mastitidního mléka ve vztahu k jeho technologické kvalitě vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

podpis diplomata

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat paní prof. Ing. Květoslavě Šustové, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady, které mi poskytovala za odborné vedení a cenné rady, které mi poskytovala během zpracování bakalářské práce a zároveň za čas, který věnovala konzultacím.

ABSTRAKT

Mastitida je velmi závažné onemocnění. Rozeznáváme klinickou a subklinickou formu, kontagiózní a environmentální mastitidu. Metod pro detekci je mnoho. Od počtu somatických buněk, měření pH, NK-testy až po detekci za pomoci enzymů. Mezi nejvýznamnější enzymy pro detekci jsou laktát dehydrogenázy, Nagasse, laktoferin, plazmin, alkalická fosfatáza a β -glukuronidáza. Diplomová práce se zabývala, zda aktivita enzymů, především laktát dehydrogenázy, odpovídá počtu somatických buněk. Tato hypotéza byla potvrzena ($p > 0,05$) Dále se zabývala otázkou, zda při odstředění dojde k poklesu počtu somatických buněk, což nebylo statisticky průkazné ($p < 0,05$).

Klíčová slova: mastitida, mléko, detekce, somatické buňky, enzymy

ABSTRACT

Mastitis is a very serious disease. We distinguish between clinical and subclinical form, contagious and environmental mastitis. Method for the detection are of many. Since somatic cell count, pH, NK assays to detect the help of enzymes. The most important enzymes for the detection of lactate dehydrogenase, Nagasse, lactoferrin, plasmin, alkaline phosphatase and β -glucuronidase. Dissertation dealt with whether the activity of enzymes, lactate dehydrogenase primarily on the number of somatic cells. This hypothesis was confirmed ($p > 0.05$) Furthermore addressed the question whether when spinning will decrease the number of somatic cells, which was statistically significant ($p < 0.05$).

Key words: mastitis, milk, detection, somatic cells, enzymes

Obsah

1	ÚVOD.....	9
2	CÍL PRÁCE	10
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	11
3.1	Mastitida	11
3.1.1	Rozdělení mastitid	14
3.1.1.1	<i>Kontagiozní mastitida.....</i>	<i>15</i>
3.1.1.2	<i>Enviromentální mastitida.....</i>	<i>16</i>
3.2	Změny mléka během mastitidy	17
3.3	Program na tlumení mastitid	18
3.4	Možnosti detekce mastitidy	18
3.4.1	Přítomnost somatických buněk v mléce.....	20
3.4.2	Elektrická vodivost	22
3.4.3	Stanovení pH mléka	23
3.4.4	Rychlý elektronický test na mastitidu	24
3.4.5	Rychlé diagnostické testy na mastitidu	24
3.4.6	Stanovení chloridů v mléce	25
3.4.7	NK testy.....	25
3.4.8	Stanovení obsahu bílkovin mléčného séra	26
3.4.9	Stanovení množství sérum albuminu	26
3.4.10	Detekce pomocí enzymů	26
3.4.10.1	<i>Detekce pomocí laktátu dehydrogenázy</i>	<i>27</i>
3.4.10.2	<i>Detekce pomocí β - glukuronidázou.....</i>	<i>28</i>
3.4.10.3	<i>Detekce pomocí alkalické fosfatázy</i>	<i>28</i>
3.4.10.4	<i>Detekce pomocí kyselé fosfatázy.....</i>	<i>29</i>
3.4.10.5	<i>Detekce pomocí amylázy</i>	<i>30</i>
3.4.10.6	<i>Detekce pomocí katalázy</i>	<i>30</i>
3.4.10.7	<i>Detekce pomocí Nagasse (N-acetyl-β-D-glykosamid)</i>	<i>31</i>

3.4.10.8	<i>Detekce pomocí laktoferinu</i>	31
3.4.10.9	<i>Detekce pomocí plazminu a plazminogenu</i>	32
4	MATERIÁL A METODIKA	34
4.1	Materiál	34
4.2	Metodika	34
4.2.1	Analýza počtu somatických buněk v mléce a aktivity LDH	34
4.2.2	Chemická analýza mléka	38
4.3	Zpracování výsledků	39
5	VÝSLEDKY	40
6	DISKUZE	47
7	ZÁVĚR	51
8	SEZNAM LITERATURY	54
9	SEZNAM TABULEK	63
10	SEZNAM OBRÁZKŮ	64

1 ÚVOD

Mastitida je onemocnění, které způsobuje velmi význačné ekonomické ztráty v chovech dojnic, koz a ovcí. Vzniká v důsledku proniknutí cizorodého mikroorganismu do organismu jedince. V důsledku imunitního systému dochází k nárůstu počtu somatických buněk, což je jeden z doprovodných znaků mastitidy. Mastitida se dělí na environmentální a kontagiózní. To je jedno hledisko rozdělení. Z dalšího hlediska se jedná o mastitidy klinickou s výraznými projevy a mastitidu subklinickou, která se navenek téměř neprojevuje. Včasná detekce mastitidy je velmi klíčová, aby nedocházelo k významným ekonomickým ztrátám v chovech. Z technologického hlediska je mléko od nakažených jedinců vyloučeno z řetězce pro výrobu potravin sloužících pro lidskou spotřebu.

Mléko od zvířete trpící mastitidou vykazuje změněné vlastnosti v porovnání s mlékem pocházejícím od zdravého jedince. Vykazuje zvýšenou proteolytickou aktivitu, dále dochází k poklesu kaseinové frakce bílkovin a nárůstu syrovátkových bílkovin v důsledku zvýšené propustnosti bariér. Dále dochází k poklesu obsahu vápníku. Zvyšuje se aktivita a množství enzymů.

V současné době se používá velká řada detekčních metod pro odhalení mastitidy v mléce. Metody se dělí do dvou velkých skupin a to metody založené naměření pomocí automatických senzorů a na metody pozorování aktivity mléka. Nejvyužívanější metodou je určení počtu somatických buněk v 1 ml mléka. V poslední době stále více využívá detekce mastitidy za pomoci enzymů a dále je velmi značně využívaný kalifornský srážecí test.

2 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo:

- prostudovat specifikaci obsahu somatických buněk v mléce kravském, kozím a ovčím.
- prostudovat charakteristiku somatických buněk
- prostudovat vliv mastitidy na složení mléka a jeho vlastnosti
- zjišťování možností mastitid či zvýšeného počtu somatických buněk v mléce
 - na základě aktivity enzymů v mléce.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

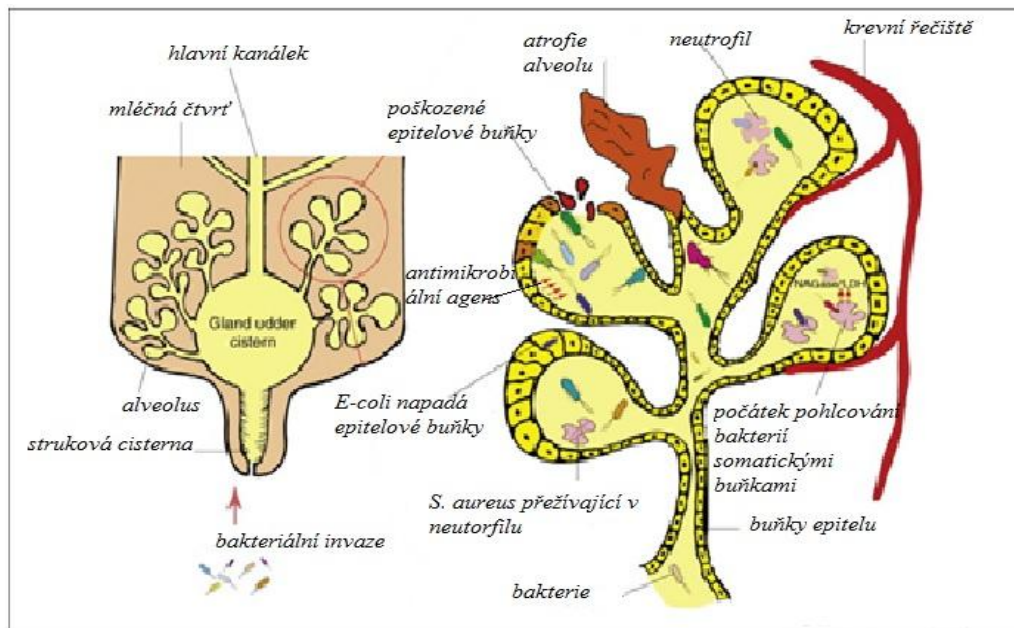
3.1 Mastitida

Mastitida je časté onemocnění ve stádech v mnoha různých zemích (GRÖHL a kol., 2004). Lze ji definovat jako zánětlivý proces (BUCEK, 2011; VIGUIER a kol., 2009), který vede k nepříznivému zdravotnímu stavu mléčné žlázy (BUCEK, 2011). Obvykle je způsobený bakteriální infekcí (FERRERO a kol., 2014; GRÖHL a kol., 2004). Jedná se o multifaktoriální onemocnění (STUHR a kol., 2013).

Mastitida patří ke globálním infekčním onemocněním, které velmi negativně ovlivňují ekonomiku chovu mléčného skotu, (BZDIL, 2011; JAGLIČ a kol., 2014; JEŽKOVÁ 2014; MIEKLEY a kol., 2012; PEREIRA a kol., 2012; VĚŘÍŠ, 2013), a ovcí (HORÁK a kol., 2012). Je nejnákladnější infekční onemocnění dojnic (LANGE – CONSIGLIO a kol., 2014; ZAVAZILOVÁ a kol., 2014). V chovu koz v našich podmínkách je zatím méně častým onemocněním (FANTOVÁ a kol., 2012). Mléko od zvířat trpící mastitidou je vyloučeno k lidské spotřebě (KAMPHANIUS a kol., 2008). Dále má velmi negativní vliv na kvalitu výrobků, v důsledku zvýšené enzymatické aktivity (FERRERO a kol., 2014).

Nejsou jednoduchým onemocněním, jelikož v patogenezi se uplatňuje celá řada mikrobiálních patogenů a současně i pestrá paleta neinfekčních faktorů (RYŠÁNEK, 2011).

Za normálních okolností je strukový kanálek těsně uzavřený a zabraňuje vstupu patogenů. Jeho okraj je lemován kreatinem, voskovitým materiálem získaného z rozvrstveného dlaždicového epitelu, který brání migraci bakterií a obsahuje antimikrobiální látky. Nicméně účinnost kreatinu je omezena. V období po porodu, tedy v době laktace, se mléko hromadí v mléčné žláze, což má za následek zvýšení tlaku uvnitř mléčné žlázy a dochází k dilataci strukového kanálku a úniku sekretů mléčné žlázy. V průběhu dojení je kreatin opláchnut při stimulaci mléčné žlázy. Tudíž se bakterie z prostředí mohou dostat přes strukový kanálek do mléčné žlázy a zapříčinit tak mastitidu, jak je znázorněno na obrázku 1 (VIGUIER a kol., 2009).



Obrázek 1: Schematické znázornění vývoje mastitidy infikovaného vemene (VIGUER a kol., 2009).

Kromě samotného zánětu mléčné žlázy mastitida ovlivňuje i snížení produkce mléka, jeho jakost poruchy reprodukce a v některých případech i systémové onemocnění s fatálními důsledky. Navíc mastitidy způsobené mikroorganismy, které mají zoonotický potenciál, představují zdravotní riziko i pro konzumenta, a to především cestou potravního řetězce (JAGLIČ a kol., 2014; LANGE – CONSIGLIO a kol., 2014).

Pro vznik mastitid hrají důležitou roli tři biosystémy, které působí současně, navzájem se ovlivňují a jejich výsledkem je rozmanitost průběhu tohoto onemocnění. Těmito biosystémy jsou dojnice, mikroorganismus a prostředí (VRŠKOVÁ a kol., 2014).

Významnou roli v šíření mastitid hraje dojení, taktéž správné ošetření vemene má vliv na zdraví mléčné žlázy (JEŽKOVÁ 2014).

Výskyt mastitid u skotu lze ze značné míry ovlivnit úpravami prostředí. Avšak neměla by se opominout možnost, že odolnost skotu vůči mastitidám, lze ovlivnit i po genetické stránce a to šlechtěním. Jako nejvíce účinnou metodou se jeví přímá selekce proti výskytu mastitidy (ZAVADILOVÁ a kol., 2014).

Na základě plemenných hodnot, případně selekčních indexů pak dochází k výběru krav a plemenů pro chov. V případě, že jsou na chov využiti jedinci s příznivými plemennými hodnotami pro rezistenci k mastitidám, lze dosáhnout snížení výskytu

mastitid ve stádech s mléčnými plemeny skotu (BUCEK, 2014). Přímá selekce je využívána dlouhá léta v severských zemích (Dánsko, Finsko, Norsko a Švédsko). V mnoha zemích je zavedena selekce na odolnost proti mastitidám nepřímo s využitím počtu somatických buněk v mléce (BUCEK, 2011).

To zda dojnice onemocní, závisí na infekčním tlaku, imunitě, dojení, léčení, kontrole a plánování. Infekční tlak je definovaný počtem patogenů, které působí na vemeno a jejich virulenci. Mastitida u dojnice propukne ve chvíli, je – li infekční tlak vysoký nebo imunita naopak velmi nízká (JEŽKOVÁ, 2014).

Příčiny vzniku mastitid lze rozdělit do dvou skupin. Na onemocnění mléčné žlázy a vývodných cest, při kterých se uplatňují mikrobiální původci a na onemocnění mléčné žlázy a vývodných cest, kde hlavní příčinou vzniku onemocnění je nesprávný postup při dojení (VRŠKOVÁ a kol., 2014). Přičemž odborníci uvádějí, že až 50 % nových infekcí ve stádě je způsobeno chybami v dojení (JEŽKOVÁ, 2014). Ovšem problém mastitid se týká i podniků s robotizovaným dojením. Statistické posouzení bazénových hodnot počtu somatických buněk v mléce při porovnání robotizovaného dojení oproti konvenčnímu přineslo nárůst o 8 %. Příčiny nárůstu jsou spatřovány ve velkých vzdálenostech, které musejí dojnice překonat k robotům a nekompletní vydojení. Neefektivní přípravě mléčné žlázy z hlediska hygieny a zejména pak nemožnost segregace nemocných dojnic (SEYDLOVÁ, 2012).

Nejvyšší výskyt mastitid je zaznamenáván krátce po porodu. Časná fáze laktace je doba, kdy většina dojnic zažívá krátkodobé podvýživy, což má negativní vliv na imunitu, která se oslabuje a dojnice je tedy citlivější pro patogeny vyvolávající mastitidy. Kromě toho imunitní systém má specifické požadavky na živiny a pokud nejsou dodávány v daném množství, imunita může selhat. U dojnic s negativní energetickou bilancí bylo prokázáno zhoršení obranných mechanismů vemene. Jako možné vysvětlení se jeví snížení schopnosti fagocytózy polymorfonukleárních neutrofilů a makrofágů a nižší tvorba chemoatraktantů pro migraci leukocytů krví do infikované mléčné žlázy. Protože pokud se buňky pohybují pomalu, nejsou schopny bojovat s bakteriemi, což vede ke vzniku klinické mastitidy. Mezi prvky a vitaminy, které zlepšují zdravotní stav mléčné žlázy, se řadí selen, vitamin E, měď, zinek, vitamin A a β -karoten (JEŽKOVÁ, 2014).

S mastitidou se můžeme setkat i u jalovic, jedná se o syndrom „letní mastitidy“. Tato forma je známá v různých zemích Evropy, kde dochází k nakažení jalovice mastitidou na pastvině, kde se nakazí prostřednictvím bodavého hmyzu. Ovšem tento

problém se netýká pouze Evropy. Hmyz a mastitidy jalovic mohou být problém i v Severní Americe (KOZÁKOVÁ, 2013).

3.1.1 Rozdělení mastitid

Etiologie mastitid je značně komplexní. Dodnes byla popsána celá škála mikroorganismů, které vyvolávají onemocnění mléčné žlázy a to ať už jako primární, či sekundární původci tohoto onemocnění (JAGLIČ a kol., 2014).

Mastitidy mohou být lehkého, středního nebo těžkého charakteru, střední a těžké vyžadují léčbu antibiotiky. U dojnic, které měly dvě mastitidy za laktaci, se podávají namísto antibiotik nesteroidní antiflogistika (JEŽKOVÁ, 2013).

Bakteriální příčiny infekce mléčné žlázy mohou být zapříčiněny Gram⁻ i Gram⁺ bakteriemi. Rozdíly mezi těmito skupinami se projevují frekvencí výskytu mastitid v průběhu laktace, aktivací obranného mechanismu, klinickými symptomy a jejich vyjádřením a změnou počtu somatických buněk (BUCEK, 2011).

Na základě epidemiologie mohou být původci mastitid rozdělení na environmentální a kontagiózní (JAGLIČ a kol., 2014).

Mastitidy se mohou vyskytovat v subklinické nebo klinické podobě (DE VLIEGHER a kol., 2012). Je známa souvislost mezi jednotlivými patogeny a formou onemocnění. Například *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* ssp, *Pseudomonas aeruginosa* a pyogenní bakterie jsou patogeny zejména klinických mastitid (JAGLIČ a kol., 2014). *Escherichia*, *Klebsiella* spp. a *Enterobacter* spp. zapříčiňují těžké perakutní a akutní mastitidy až hemoragického nebo nekrotického charakteru provázané narušením celkového zdravotního stavu (BZDIL, 2012). V chovech ovcí a koz se vyskytují převážně mastitidy se subklinickou formou projevu (MCDUGALL a kol., 2001).

Subklinické mastitidy představují problém v mnoha chovech. Jako původci subklinických mastitid u skotu jsou označovány převážně *Streptococcus agalactiae*, koaguláza negativní stafylokoky a enterokoky. Nejčastější patogeny subklinických mastitid jsou kataláza negativní stafylokoky, které nabývají v posledních letech na významu jakožto původci bovinní subklinické mastitidy. *Staphylococcus aureus* je dáván do spojitosti s oběma formami mastitid (JAGLIČ a kol., 2014; PEREIRA a kol., 2012).

Na rozdíl od klinické formy mastitidy subklinická forma nebývá vždy diagnostikována včas, což vede ke ztrátám v produkci mléka (JAGLIČ a kol., 2014). Neprojevují se žádnými viditelnými změnami na vemeni nebo v mléce, dochází pouze ke snížení produkce mléka (FERRERO a kol., 2014). Dojnice se subklinickou formou mastitidy představují významný zdroj infekce pro další krávy, přičemž cestu přenosu infekce představují zejména automatické dojící systémy (JAGLIČ a kol., 2014).

Tento typ mastitidy se detekuje pomocí laboratorních metod (analýzou na počet somatických buněk a analýzou dalších ukazatelů, které souvisejí se zánětlivými procesy), (BUCEK, 2011).

Oba typy mastitid mají stejný začátek, a to proniknutím bakterií do jejich vemene, ale příznaky jsou různé (JEŽKOVÁ, 2014). Dle epidemiologického hlediska se mastitidy dále dělí na kontagiózní a enviromentální (JAGLIČ a kol., 2014).

U koz je nejčastějším původcem onemocnění *Staphylococcus aureus*, koaguláza negativní enterokoky (PERSSON a OLOFSSON, 2011), a *Staphylococcus aureus*. V případě streptokokové infekce probíhá mastitida obvykle v podobě mírného až středně těžkého kataraktu, při kterém se onemocnění při nevhodné léčbě dostává z akutní do chronické podoby. V případě zánětu vyvolaného *Staphylococcus aureus* dochází k typické změně zbarvení kůže, které přechází od zarudnutí až fialově namodralý vzhled, k zástavě tvorby mléka a produkci abnormálního sekretu (FANTOVÁ a kol., 2012).

3.1.1.1 Kontagiózní mastitida

Jako primární zdroj kontagiózních patogenů je infikovaná mléčná žláza. Mezi původce této mastitidy jsou považovány *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, (BZDIL, 2011), *Mycoplasma* ssp. (JAGLIČ a kol., 2014) a *Corynebacterium* ssp., který způsobuje akutní i chronické záněty žlázaté i vývodné části mléčné žlázy (BZDIL, 2012).

Streptococcus agalactiae je původcem chronických mastitid, které postihují vývodnou část mléčné žlázy. Ty postupem času přecházejí v mastitidy subklinické a mohou tak uniknout pozornosti (BZDIL, 2012). Dalším původcem této formy mastitidy je *Streptococcus dysgalactiae* (JAGLIČ a kol., 2014; JEŽKOVÁ, 2013). Tento patogen vyvolává akutní i chronické záněty mléčné cisterny a strukového kanálku

(BZDIL, 2012). Ovšem tento patogen se může chovat za určitých podmínek jako environmentální původce mastitidy (JAGLIČ a kol., 2014, BZDIL, 2012).

Staphylococcus aureus vyvolává všechny typy zánětů. Přes absedující až po těžké gangrenózní, které mohou končit fatálně a mohou postihnout jak vývodnou, tak i žlázatou část mléčné žlázy. Průběh stafylokových mastitid bývá i z časového hlediska velmi pestrý. Od subklinického přes perakutní až po chronický (BZDIL, 2012).

Tato skupina mastitid se šíří z dojnice na dojnici během dojení, prostřednictvím dojícího zařízení (VRŠKOVÁ a kol., 2014). Od jedné dojnice se může nakazit až sedm dalších (JEŽKOVÁ, 2013).

Prevalence těchto patogenů narůstá především v lednu až květnu, je tedy možno se domnívat, že výskyt těchto patogenů může být ovlivněn sezónními faktory (BZDIL, 2011).

3.1.1.2 Enviromentální mastitida

Na rozdíl od kontagiózní mastitidy je primárním zdrojem patogenů prostředí (JAGLIČ a kol., 2014). Jejich šíření je spojeno s nízkou úrovní zoohygieny (BZDIL, 2012). Za původce environmentální mastitidy jsou považovány enterokoky a environmentální streptokoky, tedy jiné streptokoky než *Streptococcus agalactiae*. Například *Streptococcus uberis* (JAGLIČ a kol., 2014), který vyvolává subakutní až chronické záněty vývodné části mléčné žlázy (BZDIL, 2012). Dalšími původci environmentální mastitidy jsou enterobakterie (JAGLIČ a kol., 2014), *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. a *Enterobacter* spp., které vyvolávají klinickou formu mastitidy (BZDIL, 2012), *Serratia* spp. a *Yersinia* spp. (BZDIL, 2011) a koaguláza negativní stafylokoky (KNS) (JAGLIČ a kol., 2014) a *Enterobakter faecalis* a další (JEŽKOVÁ, 2013). U některých koaguláza negativních stafylokoků byl popsán rovněž kontagiózní přenos onemocnění. Mikroorganismy, jakými jsou například *Pseudomonas* ssp. (JAGLIČ a kol., 2014, BZDIL, 2012), která vyvolává chronické katarální záněty (BZDIL, 2012), zástupci čeledi *Pasteurellaceae*, některé anaerobní a pyogenní bakterie, kvasinky a řasy se vyskytují v souvislosti ve spojitosti s původci environmentální mastitidy velmi málo (JAGLIČ a kol., 2014). Jedná se o bakterie, které dlouhodobě přežívají ve vnějším prostředí (VRŠKOVÁ a kol., 2014).

V poslední době byl pozorován pokles incidence kontagiózních patogenů. Naopak incidence environmentálních patogenů narůstá, a to i v České republice (JAGLIČ a kol., 2014; VRŠKOVÁ a kol., 2014).

U patogenů vyvolávající environmentální mastitidy, konkrétně u nejfrekventovanějšího původce tohoto druhu mastitidy, *Streptococcus uberis*, nejsou sledovány žádné sezónní výkyvy častějšího výskytu. Pokud by ovšem nějaká sezónní závislost existovala, byla by souhrou několika faktorů, z nichž nejvýznamnější roli by mohly sehrát spíše excesy ve výživě s následnými defekty v metabolismu a imunitě zvířat. Významný vliv by mohl mít i výskyt mykotoxinů v krmivech, které mají rovněž za následek imunosupresi zvířat (BZDIL, 2011).

3.2 Změny mléka během mastitidy

Během mastitidy dochází k řadě změn ve složení mléka (KESTER a kol., 2014). Mléko od zvířat trpící mastitidou má zvýšenou proteolytickou aktivitu. Dochází k nárůstu nonplazminu. Dále dochází k proteolýze kaseinu, což má za následek snížení relativního podílu kaseinu v mléce. Jedná se zejména o α_{s1} -kasein a β -kasein. Naopak vzrůstá množství λ -kaseinu a proteoso-peptonů (SILANIKOVE a kol., 2014). Dochází ke zvýšení enzymatické aktivity mléka (STUHR a kol., 2013).

Dochází k poklesu obsahu laktózy, a to především z důvodu snížené schopnosti syntézy poškozené tkáně, ale také z důvodů menší prostupnosti jejího prekurzoru glukózy, v důsledku boje o energii mezi sekrečními buňkami a fagocytujícími buňkami. Dále dochází k poklesu dojivosti. Na druhou stranu dochází k nárůstu složek, které přechází do mléka z krve, jako jsou syrovátkové bílkoviny, v důsledku zvýšené propustnosti bariéry (DE OLIVY a kol., 2013).

Během mastitidy se zvyšuje hladina plazminu a plazminogenu, tyto změny byly spojeny s degradací kaseinu (LEITNER a kol., 2004).

Dále dochází k významnému poklesu vápníku v průběhu klinické a subklinické mastitidy. Dochází k uvolnění hydrolytických enzymů, jakými jsou laktát dehydrogenázy a β -galaktosidázy (HUSSAIN a kol., 2012).

Intramamální infekce může zvýši propustnost malých cév prostřednictvím sekrece chemických mediátorů, jako je histamin, prostaglandiny, kininy a volné kyslíkové radikály ze zánětlivých buněk (KALANTARI a kol., 2013).

Během mastitidy může dojít ke spontánní lipolýze, což vede ke zvýšení volných mastných kyselin. Obsah sodíku a draslíku je rovněž abnormální (FORSBÄCK a kol., 2009).

3.3 Program na tlumení mastitid

Je nemožné mastitidy úplně vymýtit, ale je možno jejich výskyt snížit (JEŽKOVÁ, 2014). Efektivní program na tlumení mastitid by měl být založený na omezení nových infekcí, pomocí správného řízení dojení, pečlivých aseptických postupech a léčbě již stávajících mastitid (LANGE – CONSIGLIO a kol., 2014).

Dříve než začneme s léčbou, musíme posoudit, zda je mléčná žláza, respektive dojnice léčitelná či nikoli. V případě, že má dojnice v třikrát po sobě jdoucích kontrolách užitkovosti (KU) více než 700 000 somatických buněk v 1 ml mléka, je ve většině případů neléčitelná (JEŽKOVÁ, 2013).

Samotná léčba mastitid je rozdílná podle toho, zda se jedná o klinickou či subklinickou formu mastitidy. V případě klinické je léčba založena na zlepšení welfare dojnice, ošetření vemene a maximální obnově mléčné užitkovosti. Při subklinických mastitidách se naopak léčí infikované vemeno a snižuje se infekční tlak. Mastitidy se převážně léčí pomocí antibiotik (JEŽKOVÁ, 2014).

3.4 Možnosti detekce mastitidy

Systémy pro detekci mastitid jsou stále sofistikovanější (FRIGGENS a kol., 2007). Včasná diagnóza je velmi důležitá z hlediska vysokých nákladů. Právní předpisy Evropské unie (nařízení 853/2004) zdůrazňují, že mléko určené k lidské spotřebě musí pocházet výlučně od zdravých zvířat (VIGUIER a kol., 2009).

K posouzení kvality mléka se využívá řada metod (FERRERO a kol., 2014). V současné době se dělí do dvou skupin, a to na metody založené na měření pomocí automatických senzorů a na metody pozorování aktivity mléka (MIEKLY a kol., 2012). V současné době se ve světě často používají testy zahrnující měření SCC (celkového počtu somatických buněk v 1 ml mléka), enzymatická analýza a kalifornského srážecího testu na mléko (VIGUIER a kol., 2009).

Současný trend směřuje k větší produkci mléka za účelem zvýšení zisku. Tento vývoj vytvořil potřebu senzorů a podpůrných systémů za účelem odhalit zdravotní

problémy dojnic. Nevýhodou stávajících systémů a modelů pro detekci mastitid na základě běžně užívaných senzorů je vysoký počet falešných poplachů, což brání jejich vyšší frekvenci využití v praxi. Dále je nižší využití těchto modelů v praxi zapříčiněno častou kombinací sice vysoké citlivosti ale nízkou specificitou nebo naopak. Většina automatické detekce, která byla vyvinuta pro použití na farmách, se využívá pro detekci klinických mastitid (HUYBRECHTS a kol., 2014). Tyto metody může využít jak zemědělec nebo veterinář přímo na místě a vyžadují relativně málo školení. Jeden z nejstarších takovýchto testů je kalifornský mastitis test (VIGUER a kol., 2009), jeho modifikace se využívá i u nás pod názvem NK test (VASIL', 2001).

Některé, jako např. počet somatických buněk v 1 ml mléka, jsou velmi přesné, některé slouží pro rychlý odhad. Přesné metody jsou ale velmi drahé (FERRERO a kol., 2014).

Přehled nejčastěji využívaných diagnostických metod:

- Laboratorní vyšetření mléka
- Bakteriologická diagnostika
- Cytologie mléka
- NK-testy
- Vyšetření bazénových vzorek mléka elektronickým počítačem
- Pomocné diagnostické metody:
 - pH mléka
 - stanovení obsahu chloridů
 - stanovení tuku a laktózy
 - stanovení chlórucukrového čísla
 - stanovení bílkovin v mléčném séru
 - stanovení katalázy (VASIL', 2001)
 - stanovení jiných enzymů (např. N-acetyl- β -D-glukosamidáza – tzv. Nagasse, a laktát dehydrogenáza (VIGUER a kol., 2009), kataláza, kyselá fosfatáza a další (FOX a KELLY, 2006)
- a další (VASIL', 2001).

Praktický význam z pomocných diagnostických metod mají metody na stanovení pH, obsah chloridů, určení frakcí bílkovin v mléčném séru a stanovení některých enzymů (VASIL', 2001).

3.4.1 Přítomnost somatických buněk v mléce

V důsledku mastitidy narůstá počet somatických buněk v mléce (FUTO a kol., 2012). Počet somatických buněk se používá po celém světě jako indikátor stavu mléčné žlázy (PIEPERS a kol., 2007). Počet somatických buněk je nejčastěji používaný ukazatel stavu mléčné žlázy krav, ovcí a koz (PERSSON a OLEFSSON, 2011). Používá se jako velmi přesný detektor mastitidy u kravského i kozího mléka (STUHR a kol., 2013).

Tato metoda se používá pro hodnocení kvality mléka a slouží pro zařazení mléka do jakostních tříd (RAYNAL - LJUTOVAC a kol., 2007). Jedná se o univerzální metodu pro detekci mastitidy (FERRERO a kol., 2014).

Zvýšení počtu somatických buněk v 1 ml mléka je buď důsledkem zánětlivého procesu v důsledku přítomnosti intramamární infekce, nebo na základě jiných než patologických stavů v důsledku fyziologických procesů, jako je např. říje nebo pokročilá fáze laktace (RAYNAL – LJUTOVAC a kol., 2007).

Klinické mastitidy a počty somatických buněk jsou ukazatelé, kteří mají společný základ. Obranný mechanismus proti mastitidě je založen na využití mechanické prevence proti mikroorganismům, které vstupují do mléčné žlázy, vrozenou imunitou pro bezprostřední odpověď na infekci a adaptivní imunitu, do které spadají protilátky, které jsou produkovány B-lymfocyty a Tc-lymfocyty (BUCEK, 2011).

Somatické buňky jsou pozůstatkem po bílých krvinkách v mléku s relativně malým počtem epitelových buněk sekrečního epitelu (VRŠKOVÁ a kol., 2014). Počet somatických buněk se zvyšuje, vniknou – li do vemene patogeny. Postižená tkáň mléčné žlázy na to reaguje obranou reakcí ve formě silného zánětu. Tak se ve velkých počtech přesouvají leukocyty z krve do alveol, aby patogeny, které pronikly do mléčné žlázy, fagocytovaly a zničily. Díky působení původců mastitid dochází k odumírání mlékotvorných buněk, které se společně s leukocyty mlékem vylučovány z vemene ven (JELÍNKOVÁ, 2012).

Přítomnost somatických buněk v mléce se používá celosvětově ke zjištění infikovaných dojníc (VRŠKOVÁ a kol., 2014). Ovšem posuzování zdraví vemene na základě hodnot somatických buněk pouze z jednoho měření nemá samo o sobě

dostatečnou vypovídající schopnost, respektive může vést k chybným závěrům. Vysoký obsah somatických buněk může být způsoben i v důsledku stresu či jinými faktory (JELÍNKOVÁ, 2012).

V USA je právní limit pro počet somatických buněk stanovený úřadem pro kontrolu potravin a léčiv na hranici 750 000 buněk v 1 ml mléka pro krávy, který se má nadále snižovat až na hranici, která je stejná i v rámci Evropské unie, a 1 000 000 buněk v 1 ml mléka pro ovce a kozy (PAAPE a kol., 2007).

Mléko od zdravých nebo neinfikovaných dojnic obsahuje počet somatických buněk (SCC) do hladiny 100 000 v 1 ml mléka (CHAGUNDA a kol., 2006; STUHR a kol., 2013). Top kvalitu mléka vykazují dojnice s počtem somatických buněk do 50 000 v 1 mililitru mléka (SEYDLOVÁ, 2013).

V Evropě se zvýšení hladiny somatických buněk nad 200 000 buněk v 1 ml mléka běžně používá jako indikátor mastitidy (VIGUIER a kol., 2009). Někteří autoři poukázali na možnost infikované jedné čtvrti vemene dojnice již při hodnotách počtu 100 000 somatických buněk v 1 ml mléka (VRŠKOVÁ a kol., 2014).

Zastoupení dojnic s počtem somatických buněk do 50 000 v průběhu laktace klesá, a to až na polovinu výskytu. Tolerovaná hranice pro počet somatických buněk je ještě od 51 000 do 100 000. Zastoupení počtu somatických buněk od 101 000 do 800 000 se prodlužující dobou, po kterou je produkováno mléko významně zvyšuje. Procentuální zastoupení dojnic s počtem somatických buněk přesahujících 800 000 je vysoké, ale relativně stálé v průběhu celé laktace. Vážený průměr počtu somatických buněk na začátku laktace, do 40 dnů po otelení, a nad 305 dnů je vysoký a dosahuje až 280 000. Střed laktace vykazuje nižší hodnoty (SEYDLOVÁ, 2013).

U ovcí se musí počítat, že je počet somatických buněk vyšší než v kravském mléce. Fyziologická hranice kolísá mezi hodnotami 0 až 500 000 v 1 ml mléka. Střední zánět se vyznačuje počtem somatických buněk v rozmezí od 500 000 do 2 000 000 v 1 ml mléka (HORÁK a kol., 2012).

V porovnání s počtem somatických buněk u ovcí a krav je u koz počet somatických buněk o poznání vyšší, a to i u vzorků mléka ze zdravého vemene a zvyšuje se po celou dobu laktace. Dále se značně liší výsledky od jednotlivých jedinců. Počet somatických buněk v mléce koz je více ovlivněn normálními fyziologickými faktory než u krav, proto zde nemohou platit normy jako pro počet somatických buněk u krav (PERSSON a OLOFSSON, 2011).

Na rozdíl od krav je sekrece mléka u ovcí a koz apokrinní a cytoplazmatické částice, které jsou podobné somatickým buňkám, jsou normální součástí mléka. Tyto částice nejsou klasifikovány jako buňky, jelikož neobsahují jádra nebo DNA, i když obsahují značné množství RNA a proteinů (SOUZA a kol., 2012).

Průměrný počet somatických buněk od zdravých koz se pohybuje 50 000 - 400 000 v 1 ml mléka na počátku laktace (MCDOUGALL a kol., 2001). V průběhu laktace může docházet k výkyvům a počet somatických buněk může překročit hodnotu 1 000 000 buněk v 1 ml mléka, aniž by tato hodnota znamenala infekci mléčné žlázy. V USA je limit počtu somatických buněk stanoven na 1 000 000 buněk v 1 ml mléka, zatímco směrnice Evropské unie zatím neobsahují zákonné požadavky na hodnotu SCC pro mléko koz (STUHR a kol., 2013).

Ovšem vysoký počet somatických buněk v mléce nutně nemusí neznámenat pouze onemocnění dojnice mastitidou, ale je zapříčiněn i řadou jiných parametrů (KALANTARI a kol., 2013).

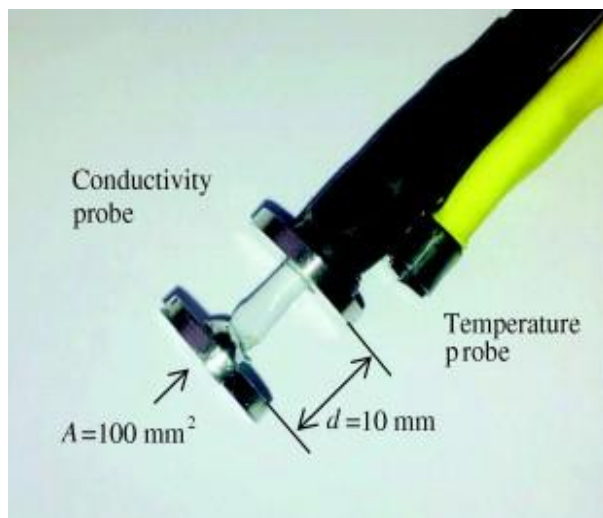
3.4.2 Elektrická vodivost

Jedním z dalších průkazů mastitidy je zvýšená elektrická vodivost (ASHELY a LI, 2013). Elektrická vodivost je důležitou vlastností iontových roztoků použitých pro analytické účely. Elektrická vodivost patří k nejvíce rozšířeným metodám automatické detekce pro klinické mastitidy (KAMPHANIUS a kol., 2008; MIEKLEY a kol., 2012).

Tento test měří zvýšení vodivosti v mléce, která je způsobena výškou hladiny iontů, jako je sodík, draslík, vápník, hořčík a chlorid v průběhu zánětu (VIGUIER a kol., 2009).

Používá se pro rychlou kontrolu přijatelnosti mléka pro sledování účinků infekce mléčné žlázy. Běžné kravské mléko má hodnoty elektrické vodivosti mezi 4,0 – 6,0 mS. cm⁻¹. Ovšem mléko od dojnic, které trpí mastitidou je lepším vodičem pro elektrický proud, což je způsobeno důsledkem zvýšené hladiny Na⁺ a Cl⁻ iontů a současněmu snížení K⁺ iontů a laktózy. Z tohoto důvodu může měření elektrické vodivosti pomoci pro včasné zjištění subklinické mastitidy. Hodnoty elektrické vodivosti od dojnic trpící mastitidou se pohybují od hodnot 6,5 mS. cm⁻¹ až do extrémních hodnot 13,00 mS.cm⁻¹ při teplotě 18°C. Aby se předešlo chybám,

které vyplývají z polarizačních efektů elektrody, je třeba, aby elektrické měření bylo prováděno o vysoké frekvenci. (FERRERO a kol., 2014).



Obrázek 2: Vodivostní cela vyrobená v laboratoři (FERRERO a kol., 2014)

Vodivostní cela se skládá ze dvou elektrod z nerezavějící oceli o ploše 100 mm^2 a umístěné od sebe na vzdálenost 10 mm . Středem kroužků prochází koaxiální kabel (FERRERO a kol., 2014). Je dostatečným senzorem pro detekci klinické mastitidy, ale produkuje velké množství falešných poplachů (HOGEVEEN, 2011).

3.4.3 Stanovení pH mléka

Stanovení pH mléka se provádí pomocí indikátorových papírků nebo pH metrem, tedy potenciometricky (VASIL', 2001). Nárůst pH mléka z důvodu mastitidy je detekován pomocí bromthymolové modře (VIGUIER a kol., 2009).

Mléko od zdravé dojnice má hodnoty pH v rozpětí $6,3 - 6,7$. Během akutní mastitidy je hodnota pH $6,95 - 7,3$ a více. U chronické formy se rozpětí pH nachází ve fyziologickém rozmezí hodnot nebo je mírně alkalické (VASIL', 2001). Fyziologické hodnoty pH kozího mléka se pohybují okolo $6,50 - 6,80$, u ovčího jsou tyto hodnoty v rozmezí $6,51 - 6,85$ (PARK a kol., 2007).

Jedná se o parametr, kterým lze stanovit změny ve zdraví mléčné žlázy (FUTO a kol., 2012). Výhodou testu je jeho rychlost detekce a nízké náklady na zařízení.

Nevýhodou naopak malá citlivost v porovnání s ostatními testy (VIGUIER a kol., 2009).

3.4.4 Rychlý elektronický test na mastitidu

REM-test, rychlý elektronický mastitis test, je přístroj, který umožňuje denní sledování zdravotního stavu dojnic. Na přední straně přístroje se nachází 4 odděleně vyspárované plochy, které slouží pro oddoj mléka z jednotlivých čtvrtí vemene. Tyto plochy ústí do komůrek, ve kterých se nacházejí elektrody. Mezi nimi ve středu se nachází pátá společná komůrka, která slouží na měření teploty mléka. Přístroj má v sobě zabudovaný mikropočítač, což umožňuje jeho plně automatickou funkci (TONGEL', 2014).

Do přístroje se oddojují první stříky mléka před dojením. Po oddojení mléka do příslušných komůrek se stačí na přístroji klávesa „S“ a odstartuje se měření. V případě, že měrná hodnota elektrické vodivosti mléka v některé ze čtvrtí překročí stanovenou hraniční hodnotu, začne na ovládacím panelu přerušovaně svítit červené kontrolní světlo, které patří k dané čtvrti vemene. Tím je signalizované případné onemocnění mléčné žlázy mastitidou. Po skončení měření je potřebné připojit přístroj na běžný osobní počítač a naměřené hodnoty do něho přehrát. Příslušný program poté nahrané údaje automaticky zpracuje a uloží na disk pro potřebu veterinárního lékaře či zootechnika (TOGEL', 2014).

3.4.5 Rychlé diagnostické testy na mastitidu

Testy pro rychlou diagnostiku se již několik let úspěšně používají v USA v běžné farmářské praxi. Nebyly vyvinuty pro detailní a přesnou diagnostiku daného patogenu způsobujícího mastitidu. Součástí sady je manuál. Na povrch selektivních agarů v Petriho misce se nanese jednorázovou bakteriologickou kličkou vzorek mléka z postižené čtvrti. Dále je agar v Petriho misce umístěn do termostatu na 24 hodin a inkubován při teplotě 37°C. Výsledek se poté odečte podle přiloženého schéma (VĚŘÍŠ, 2013).

Situace v podnicích v České republice však umožňují i jiný systém užití testů. Prvním předpokladem pro úspěšné zavedení rychlé diagnostiky mastitid je dokonalé zmapování spektra patogenů v daném podniku. To znamená, ve spolupráci s veterinárním lékařem, se odeberou od vhodných dojnic čtvrt'ové vzorky a pošlou

se na SVÚ (Státní veterinární ústav). Načež je odeslány do podniku seznam nalezených kmenů patogenů. V případě environmentálních mastitid je způsob detekce založen na nárůstu PSB (počtu somatických buněk). Odhalíme je jako subklinické. Provedeme odběr vzorku mléka z dané čtvrti do sterilní zkumavky po předchozím očištění konce struku tamponem, který je napuštěný alkoholem. Sterilní jednorázovou kličkou nanese po kapce na povrch jednotlivých sektorů se selektivními agary a inkubujeme 24 hodin při teplotě 37,2°C (VĚŘÍŠ, 2013).

3.4.6 Stanovení chloridů v mléce

Jedná se o parametr, kterým lze detekovat mastitidu (DA SILVA a kol., 2005). Jeho obsah je podmíněn mnoha faktory, při čemž diagnosticky významná je skutečnost, že poškození sekrečního epitelu mléčné žlázy má za následek zvýšený obsah chloridů v mléce. Za normálních okolností je obsah chloridů ve všech čtvrtích stejný, maximum je 30 g.l⁻¹. Hodnota 36,7 g.l⁻¹ poukazuje na zvýšení chloridů v mléce. Toto stanovení se následně využívá v diagnostice sekrečních poruch mléčné žlázy, a to pomocí měření elektrické vodivosti mléka (VASIL', 2001), dále potenciometrií, potenciometrickou titrací, fotometrií, spektrometrií (DA SILVA a kol., 2005).

3.4.7 NK testy

NK- test je modifikací kalifornského testu na mastitidy. Diagnostickou reagensií je zde červený průsvitný roztok povrchově aktivních látek, alkylarylsulfonátu a fenolové červeně v destilované vodě, s upravenou koncentrací vodíkových iontů (VASIL', 2001).

Zkouška se provádí na miskách, které jsou umístěny na posuzovací paletě. 2 ml čerstvě nadojeného mléka se smísí spolu s 2 ml reagensie a při naklánění palety pod úhlem 45° se posuzuje reakce, která proběhne zpravidla do 30 sekund. Pozitivní reakce se projevuje výraznou tvorbou vloček a změnou konzistence ve formě zgelovatění až koagulace. Působení rozdílného pH na barevný indikátor způsobí současně barevnou reakci (VASIL', 2001).

Tato metoda je založena na principu, že po přidání detergentu do vzorku mléka s vysokým počtem somatických buněk, dojde k lýze buněk s následným uvolněním nukleových kyselin a jiných složek buněčného obsahu, což vede k vytvoření tzv. gelové konzistence. Nicméně výklad může být subjektivní, a to může mít za následek falešný

poplach ohledně mastitidy. Výhodou této metody je jeho rychlost, test lze použít přímo na místě, nízké pořizovací náklady. Nevýhodou již zmíněná obtížná interpretace výsledků a nízká citlivost (VIGUIER a kol., 2009).

3.4.8 Stanovení obsahu bílkovin mléčného séra

Celkově se obsah bílkovin v mléce dojnic pohybuje v rozmezí hodnot 2,7 – 4,4 %. Nejvíce je zastoupený kasein (2,7 %), dále mléčný albumin (0,3 – 0,5 %) a nejméně globulin (0,1 %). Během mastitidy se mění poměr zastoupení jednotlivých složek bílkovin mléka ve prospěch bílkovin mléčného séra, které se do mléka dostávají přes zánětem narušenou bariéru krev – mléko. Albumin -- globulinový koeficient klesá z fyziologických 3,41 na hodnotu 1,4 u subakutní formy mastitidy a až na 0,7 u klinické formy mastitidy (VASIL', 2001). Ovčí mléko má obsah bílkovin v průměru 5,8 % a kozí 4,6 % (PARK a kol., 2007).

Stanovení bílkovin mléčného séra se provádí pomocí chromatografických, elektroforetických metod a UV spektrofotometrií (BORDIN a kol., 2001).

3.4.9 Stanovení množství sérum albuminu

Jedná se o parametr, který byl studován jako potenciální indikátor změn stavu mléčné žlázy (FUTO a kol., 2012). Množství sérum albuminu se stanovuje radiálním testem imunodifúze. Jedná se o velmi citlivou metodou, která je založena na radiální difúzi sérového albuminu proti králičímu antiséru. Normální koncentrace bovinního sérového albuminu se pohybuje 0,1 – 0,4 mg.ml⁻¹. Zvýšení hodnoty na 0,5 mg.ml⁻¹ signalizuje zánět mléčné žlázy (VASIL', 2001).

3.4.10 Detekce pomocí enzymů

Výzkum změn enzymových aktivit, spojených s výskytem původce onemocnění, může vést k včasné detekci mastitidy (STUHR a kol., 2013). Enzymy jsou proteiny, které jsou biologickými katalyzátory (FOX a KELLY, 2006; YANG a kol., 2014). Jsou produkovány buňkami a hrají důležitou roli v procesu metabolismu těl. Další z jejich funkcí je antioxidační a jsou součástí vrozené imunity (YANG a kol., 2014).

Testy jsou rychlé, ale zatím se pro přesnější stanovení využívají jen v laboratořích (VIGUIER a kol., 2009).

Mnohé z testů jsou ale časově velmi náročné pro analýzu ve velkém měřítku (WELBECK a kol., 2011). Po řadu let se již používají jako biomarkery k identifikaci mastitidy. Zatím se stále prokazuje, že měření enzymatické aktivity má diagnostický potenciál pro detekci mastitid (KALANTARI a kol., 2013).

3.4.10.1 Detekce pomocí laktátu dehydrogenázy

Laktát dehydrogenáza (LDH nebo LD) je všudypřítomný enzym, který se vyskytuje u obratlovců, bezobratlých, rostlin a u mikrobů byl objeven v raném období enzymologie. LDH je enzym, který je velmi rozšířený v celém organismu, intracelulárně i extracelulárně (LARSENA a kol., 2010). Enzym se běžně vyskytuje v několika rozdílných molekulárních formách (KOPPERSCHLÄGER a KIRCHBERGER, 1996). LDH je cytoplazmatický enzym (KALANTARI a kol., 2013). Jedná se o enzym složený ze čtyř podjednotek, které tvoří až pět možných kombinací LD₁ – LD₅ (ZEHNÁLEK, 2014).

Jeho obsah se prokazatelně zvyšuje během zánětu a působí tak, jako časný ukazatel mastitidy (WELBECK a kol., 2011).

LDH je nativní složkou mléka, ačkoli ne původní. Předpokládalo se, že zvýšená aktivita LDH v mastitidním mléce je zapříčiněna v důsledku průniku LDH z krevní plazmy. Ale jako více pravděpodobný důvod zvýšení aktivity tohoto enzymu se jevil důsledek porušených parenchymatických buněk a rozrušení leukocytů, což bylo následně i potvrzeno. Další nárůst aktivity LDH pochází z rozrušených granulocytů a lymfocytů (LARSENA a kol., 2010).

Laktát dehydrogenáza (LDH) se může uvolnit v průběhu imunitní odpovědi u leukocytů a parenchymálních buněk mléčné žlázy. Uvolnění enzymů do mléka lze pozorovat po infuzi stafylokokového α -hemolyzinu. Laktát dehydrogenáza slouží v tomto případě jako ukazatel rostoucí mléčné propustnosti. Byly provedeny testy u kravského mléka na ověření hodnot počtu somatických buněk a úrovně laktátu dehydrogenázy. Ověření toho modelu pro kozí mléko musí být ale ještě provedeno (STUHR a kol., 2013). Původ zvýšení laktát dehydrogenázy v mléce v důsledku zvýšení počtu leukocytů v postižené tkáni (KALANTARI a kol., 2013) a ze somatických buněk během mastitidy po invazi mikroorganismů (LARSEN, 2005).

KATSOULOS a kol. 2010 identifikoval aktivitu laktátu dehydrogenázy jako nejspolehlivější ukazatel u tří analyzovaných enzymů, kterými byly alkalická fosfatáza, aspartátaminotrasferáza a laktát dehydrogenázy pro detekci mastitid mléka ovcí a koz. Bylo prokázáno, že v případě subklinických mastitid je aktivita laktátu dehydrogenázy vyšší v bakteriologicky negativních vzorcích kravského mléka.

Ale stále je velmi málo údajů o laktátu dehydrogenázy, jako spolehlivém markru pro detekci mastitidy u koz (STUHR a kol., 2013).

FRIGGENS a kol., 2007 testovali dynamický deternický model pro včasné zjištění mastitidy pomocí laktátu dehydrogenázy jako indikátoru v mléce. Aby byli schopni posoudit, zda je laktátu dehydrogenázy dostatečným faktorem pro posouzení mastitidy dojnice, měli k dispozici hodnoty počtu somatických buněk. Bylo prokázáno, že aktivita laktátu dehydrogenázy se zvyšuje u mléka od dojnic infikovaných mastitidou.

Koncentrace laktátu dehydrogenázy v průběhu zánětu mléčné žlázy má potenciál, aby byla používána jako screeningový test pro detekci subklinické mastitidy (KALANTARI a kol., 2014).

Další možností jsou testy Udder Check. Tento test bude popsán v kapitole Materiál a metodika.

3.4.10.2 Detekce pomocí β - glukuronidázou

β - glukuronidáza patří do skupiny hydroláz. V důsledku imunitní odpovědi těla dochází k zvýšení její hladiny. Dříve nebyla považována za citlivý parametr pro detekci mastitidy, ale po pokusech, které byly provedeny v roce 1986 je detekce pomocí β – glukuronidázy považována jako citlivý a velmi efektivní parametr pro hodnocení mastitidy u dojnic. Pro detekci mastitidy u kozího mléka je potřebné jeho hladinu posoudit na základě výsledků počtu somatických buněk (STUHR a kol., 2013).

3.4.10.3 Detekce pomocí alkalické fosfatázy

Pod pojmem alkalická fosfatáza zahrnuje celou skupinu relativně nespecifických enzymů, které při alkalickém pH hydrolyticky štěpí různé estery kyseliny fosforečné (ZEHNÁLEK, 2014).

Alkalická fosfatáza (ALP) je membránově vázaný glykoprotein, který je široce distribuován v živočišných tkáních a mikroorganismy. Výskyt alkalické fosfatázy v mléce byl poprvé uznán v roce 1952 (FOX a KELLY, 2006).

Alkalická fosfatáza v mléce je přírodní fosfatáza, která se podílí na metabolismu. Jedná se o jeden z endogenních enzymů v mléce. U skotu hraje důležitou roli v metabolismu glukózy. Je klíčovým enzymem při trávení a metabolismu tuku (YANG a kol., 2014). Jedná se o monoesterázu, která katalyzuje hydrolyzu monoesterů (HANUŠ a kol., 2008). Její aktivita může být ovlivněna mnoha faktory (YANG a kol., 2014).

V mléce jednotlivých živočišných druhů (CHOVANEC a kol., 2008) a mezi jednotlivci v rámci stáda (FOX a KELLY, 2006) se její obsah značně liší. Její zvýšená hladina je především během mastitid. Aktivita alkalické fosfatázy je velmi úzce spjata i s celkovým počtem mikroorganismů (CPM). Při zvýšeném počtu CPM dochází i k nárůstu aktivity alkalické fosfatázy v mléce, což je jev v důsledku vzniku mikrobiální alkalické fosfatázy. Vyšší aktivita je rovněž v mlezivu (CHOVANEC a kol., 2008).

Nárůst koncentrace a aktivity alkalické fosfatázy je vyvolán během zánětlivého procesu leukocyty, poškozenými intersticiálními buňkami epitelu a poškozenými leukocyty, stejně jako laktát dehydrogenázy (KALANTARI a kol., 2013). Aktivita se mění nepřímo v závislosti na dojivosti, ale je nezávislá na obsahu tuku, na chovu a stravě (FOX a KELLY, 2006).

3.4.10.4 Detekce pomocí kyselé fosfatázy

Kyselá fosfatáza se na rozdíl od alkalické formy tohoto enzymu nachází výhradně jen v leukocytech. V mléce je její obsah téměř nepatrný. Její aktivita se výrazně zvyšuje během onemocnění mléčné žlázy. Rovněž je její aktivita vyšší v mlezivu (GAJDŮŠEK, 2003).

Enzym na rozdíl od své alkalické formy není aktivován Mg^{2+} ale je mírně aktivován Mn^{2+} a je velmi silně inhibován fluoridem (FOX a KELLY, 2006).

Aktivita kyselé fosfatázy dosahuje svého maxima 5 – 6 dní po porodu, načež následuje pokles, který zůstává na nízké hladině až do konce laktace (FOX a MCSWEENEY, 1998; FOX a KELLY, 2006). Nárůst aktivity enzymu je vyvolán nástupem mastitidy (FOX a KELLY, 2006). Kyselá fosfatáza se vyskytuje v mléčném

séru (LUKAŠOVÁ, 1999). Vzhledem k alkalické formě fosfatázy, je její aktivita poměrně nízká, asi 2 % (FOX a MCSWEENEY, 1998).

3.4.10.5 Detekce pomocí amylázy

Amyláza pochází hlavně ze slinných žláz a pankreatické tkáně. Její účinek spočívá ve štěpení škrobu. Jedná se o hydrolázu (YANG a kol., 2014). Nachází se ve dvou formách α -amyláza a β -amyláza (FOX a KELLY, 2006). V mléce je vyšší obsah α -amylázy. Vyskytuje se v laktoglobulinové frakci syrovátkových bílkovin (LUKAŠOVÁ, 1999).

Amyláza je hlavním enzymem se sacharidovou aktivitou. Aktivita amylázy v těle je velmi nízká. Aktivita amylázy se zvyšuje při rozkladu buněčných stěn mikroorganismů (YANG a kol., 2014).

Aktivita amylázy se různí, vyšší je v mlezivu, ale po několika dnech se její aktivita snižuje na minimum a opět se zvyšuje ke konci laktačního období. Amylázová aktivita je úzce spojena s druhem zvířete, stádiem laktace, věkem, zdravotním stavem, výživou zvířete a individualitou jedince. Jakmile dojde ke zvýšení leukocytů v mléce, stoupá i aktivita amylázy což slouží jako vhodný marker detekce mastitid (GAJDŮŠEK, 2003). Amyláza je poměrně tepelně stabilní enzym (FOX a KELLY, 2006).

Vzhledem k tomu, že kravské mléko neobsahuje škrob ale pouze nízké hladiny oligosacharidů, je funkce amylázy v mléce nejasná (FOX a KELLY, 2006).

3.4.10.6 Detekce pomocí katalázy

Kataláza je hem obsahující enzym, který je distribuován široce v rostlinných, mikrobiálních a živočišných tkáních a sekretů. Jedná se o jeden z prvních enzymů, který byl prokázán v mléce (FOX a KELLY, 2006).

Kataláza je enzym, který je v mléce obsažen vždy. Využívá se k detekci mastitidy, jelikož je obsažena v leukocytech. Aktivita katalázy je vyšší v mlezivu (GAJDŮŠEK, 2003), při nárůstu počtu somatických buněk (FUTO a kol., 2012), při mastitidě se aktivita zvyšuje výrazně (FOX a KELLY, 2006) a při všech případech poruch sekrece mléka (GADŮŠEK, 2003; ASHELY a LI, 2013). Aktivita katalázy v syrovém mléce je přímo úměrná počtu somatických buněk, což z katalázy dělá užitečný ukazatel mastitidy, jehož aktivita by mohla být bioindikátorem mastitidy (FUTO a kol., 2012).

Mnohem častěji se pro stanovení mastitidy používají ukazatelé, jakými jsou počet somatických buněk, aktivita N-acetyl- β -D-glykosamidu nebo elektrická vodivost (FOX a KELLY, 2006).

Úlohou katalázy v mléce je rozklad peroxidu vodíku na vodu a kyslík (FOX a KELLY, 2006). Kataláza dále v mléce přeměňuje dusitaný na dusičnany. Rychlost oxidace dusitanů v mléce na dusičnany je přímo úměrná koncentraci tohoto enzymu. Její aktivita v kravském mléce je $2 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ (SILANIKOVE a kol., 2009).

Kataláza se nabaluje na povrch tukových kuliček a při odstředění přechází do smetany (LUKAŠOVÁ, 1999). FUTO a kol., 2012 prokázali, že zvýšená aktivita katalázy ve vzorcích mléka je rychlou a snadnou detekcí pro mastitidu a abnormální mléka.

3.4.10.7 Detekce pomocí Nagasse (N-acetyl- β -D-glykosamid)

N-acetyl- β -D-glykosamid je enzym mléka, který propouštěn buňkami epitelu a polymornukleárních leukocytů a katalyzuje buněčné reakce, které pomáhají imunitnímu systému proti patogenům (STUHR a kol, 20013). Jedná se o enzym lysozomálního charakteru, který pochází hlavně z epiteliálních buněk mléčné žlázy a v menší míře ze somatických buněk (LARSENA a kol., 2010; FOX a KELLY, 2006).

Ze studií lze předpokládat, že tento enzym je indikátorem pro antimikrobiální účinky v průběhu zánětlivého procesu (URECH a kol., 1999; STUHR a kol., 2013).

Hladina enzymu se zvyšuje při onemocnění mléčné žlázy. Tento enzym lze využít i jako ligand v biosenzorech, kdy se povrch čipu imobilizuje pomocí tohoto enzymu. Enzymová aktivita u mléka pocházejícího od zdravých krav je $25 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$, zvýšení aktivity na 30 U/L signalizuje mléko od zvířete s mastitidou (WELBECK a kol., 2011).

3.4.10.8 Detekce pomocí laktoferinu

Laktoferin je železo vázající glykoprotein (MOLENAAR a kol., 1996; HISS a kol., 2008) a je považován za hlavní část nespecifické rezistence onemocnění komplexu v mléčné žláze (HISS a kol., 2008). Jedná se o enzym, který má v těle mnoho funkcí, mezi nejvýznamnější patří přenos železa a antibakteriální funkce (MOLENNAR a kol., 1996). Zabraňuje množení bakterií během mastitidy. Koncentrace laktoferinu se zvyšuje

v průběhu subklinické mastitidy a významně koreluje s počtem somatických buněk (FORSBÄCK a kol., 2009).

U krav byl pozorován vliv fyziologických faktorů na koncentraci laktoferinu v mléce. U laktoferinu byla vysledována přímá úměra na nárůstu počtu somatických buněk (HISS a kol., 2008).

HISS a kol., 2008 se pokusili potvrdit tuto úměru i u kozího mléka. Výsledkem bylo, že oba parametry, obsah laktoferinu v závislosti na počtu somatických buněk, jsou ovlivněny různými faktory. Nicméně, regulace obou parametrů nelze snadno srovnávat. SCC obsahuje buněčné elementy, které se dostávají do mléka z krevního oběhu, zatímco laktoferin je syntetizován přímo v mléčné žláze. Zvýšená hladina somatických buněk je iniciována chemoatraktanty, součásti nebo metabolity bakterií, ale i endogenními složkami, včetně cytosinů nebo složkami komplexu. Chemoatraktanty jsou hormony lokomoce (schopnost pohybu). Jedná se anorganické nebo organické sloučeniny, které indukují chemotaxe. Chemotaxe je pohyb organismů vyvolaný chemickým podrážděním (BARKEFORS a kol., 2008). Cytosiny jsou regulovány v průběhu fyziologických procesů a mohou mít vliv na množství laktoferinu. Ačkoli existuje přímá úměra mezi počtem somatických buněk a obsahem laktoferinu v mléce, nelze dojít k závěru, zda může být laktoferin použitý jako parametr vedle nebo namísto počtu somatických buněk pro posouzení kvality kozího mléka (HISS a kol., 2008).

3.4.10.9 Detekce pomocí plazminu a plazminogenu

Plazmin je hlavní proteolytický enzym v mléce krav a ovcí, ve kterém se vyskytuje společně s neaktivním plazminogenem (LEITNER a kol., 2004) a aktivátory plazminogenu, které jej aktivují na plazmin (LEITNER a kol., 2004; FOX a KELLY, 2006) a inhibitory plazminogenu a plazminu (FOX a KELLY, 2006).

Jedná se o nejvýznamnější proteolytický enzym v mléce (THEODORU a kol, 2007; CORTELLINO a kol, 2006). Bovinní plazminogen je jednořetězcový glykoprotein obsahující 786 aminokyselinových zbytků s vysokou molekulovou hmotností. Plazminogen se převede na plazmin štěpením peptidické vazby mezi 557. a 558. aminokyselinou, konkrétně mezi argininem a izoleucinem, pomocí specifických proteáz. Plazmin má optimální aktivitu při pH 7,5 a teplotě 37°C (FOX a KELLY, 2006).

Plazmin hydrolyzuje α_{s2} -kasein a β -kasein (THEODORU a kol., 2007; CORTELLINO a kol., 200; FOX a KELLY, 2006), α_{s1} -kasein na γ -kasein a proteozo-peptony (BASTIAN a BROWN, 1996). Dále snižuje schopnost mléka k dalšímu zpracování. Zvýšení plazminogenu a plazminu v mléce má negativní vztah ke koagulaci mléčných bílkovin, dochází ke zhoršení koagulačních schopností (THEODORU a kol., 2007).

Nárůst plazminogenu a plazminu je registrován na konci laktace (THEODORU a kol., 2007; FOX a KELLY, 2006). Jeho obsah se zvyšuje při onemocnění mléčné žlázy (URECH a kol., 1999; FOX a KELLY, 2006; BASTIAN a BROWN, 1996). Nárůst koncentrace plazminu a plazminogenu je z krevního řečiště (FOX a KELLY, 2006).

Systém plazmin-plazminogen je ovlivněn zdravotním stavem zvířete. Na základě studií bylo zjištěno, že aktivita plazminu vzrůstá se zvyšujícím se počtem somatických buněk, zatímco aktivita plazminogenu není závislá na počtu somatických buněk vůbec (THEODORU a kol., 2007).

V mléce se plazmin váže na povrch kaseinových micel, které slouží jako jeho substrát (CORTELLINO a kol., 2006). Hlavním substrátem je pro plazmin β -kasein. Během procesu sýření přechází do sýřeniny, zatímco inhibitory plazminu a plazminogenu jsou rozpustné v mléčném séru (FOX a KELLY, 2006). Plazmin má afinitu k lyzinovým a argininovým zbytkům, a přednostně štěpí lysin-arginové vazby (BASTIAN a BROWN, 1996).

CORTELLINO a kol., 2006 provedli studii, která se zabývala aktivitou plazminu a plazminogenu v mléce koz. Zjistili, že aktivita plazminu byla vyšší než aktivita u ostatních přežvýkavců (pro porovnání s kravským mlékem o 17 – 50 %, oproti ovčímu o 45 %), zatímco aktivita plazminogenu byla výrazně nižší.

Plazmin je velmi teplozně stabilní enzym a v posledních letech se stal velmi významným enzymem v mléce. V důsledku toho se stal předmětem značného výzkumu (FOX a KELLY, 2006).

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Materiál

Pro měření byly použity individuální vzorky mléka od dojnic. Celkem bylo testováno 72 vzorků z čehož 48 vzorků pocházelo od dojnic ze zemědělského podniku Miroslav a zbytek od drobných chovatelů. Mléko bylo po nadojení zchlazeno a převezeno do laboratoře ústavu technologie potravin Mendelovy univerzity, kde zůstalo uchováno v chladničce až do doby měření a následně bylo zahřáno na teplotu 20°C. Množství a aktivita enzymů, společně s počtem somatických buněk byla určována v syrovém mléce, ze kterého byly odstředěny somatické buňky, i v syrovém mléce, ze kterého nebyly somatické buňky odstředěny. Mléko bylo odstředěno vždy v den měření při 1000 otáčkách po dobu 5 minut teplotě odstředivky nastavené na teplotu mléka, která činila 20°C.

Na analýzu pro odhad počtu somatických buněk na základě množství enzymů a na aktivitu laktátu dehydrogenázy byly použity testy od výrobce Porta check, Inc. Tato společnost byla založena v roce 2004 se zaměřením na marketing a prodej přenosných testovacích zařízení pro mlékárenský průmysl (<http://www.portacheck.com/history.php>).

4.2 Metodika

Chemická analýza byla provedena v laboratoři ústavu technologie potravin Mendelovy univerzity. U vzorků bylo stanovováno pH, °SH, dále testy na aktivitu laktátu dehydrogenázy (Under Quick) a testy na odhad počtu somatických buněk (The Porta SCC milk test – vizuálně a pomocí elektronického přístroje a The Porta SCC quick test).

4.2.1 Analýza počtu somatických buněk v mléce a aktivity LDH

Analýza proběhla v laboratoři ústavu technologie potravin Mendelovy univerzity a pro porovnání počtu somatických buněk s certifikovanou metodou byla analýza na počet somatických buněk provedena ještě v akreditované laboratoři pro rozbor mléka v Brně, Tuřanech. Laboratoř spadá pod Českomoravský svaz chovatelů a.s., kde byl počet somatických buněk určen stanovením za pomoci fluoro-opto-elektronické metody. Pro tento postup jsou somatické buňky v mléce definovány jako částice, které mají minimální intenzitu fluorescence, což je způsobeno vlivem barvení fluorescenčním

barvivem. Obarvené somatické buňky vytvářejí v průtočném cytometru elektrický impuls, který je následně registrován. Jedná se tedy o nepřímou metodu a přístroj je nastavován podle referenční metody. Stabilita nastavení je natolik robustní, že úroveň měření je kontrolována za použití standardů. Tudíž není nutno provádět pravidelné kalibrace. Na rozdíl od stanovení obsahu ostatních složek mléka (ČSN EN ISO 12366 – 2:2007).

Počty somatických buněk byly měřeny jak u neodstředěného mléka, u všech 72 vzorků, tak i u odstředěného (pouze 12 vzorků).

Pro celkový počet somatických buněk v mléce v laboratoři MENDELU byly použity následující testy:

- *The Porta SCC milk test* - byl vyhodnocován pomocí barevné škály, která byla součástí balení. Tento test byl vyvinut pro odhad somatických buněk od jednotlivých krav. Test byl hodnocen na univerzitách v USA a v Kanadě a bylo prokázáno, že má dobrou korelaci s laboratorními výsledky. Jedná se o test, který je založen na chemické reakci mezi barvivem, které je nanášeno na testovacím proužku, a enzymem, který detekuje somatické buňky v mléce. V přítomnosti somatických buněk v mléce dochází ke změně barvy testovacího proužku z bezbarvé na modrou. Čím je barva tmavší, tím je výskyt somatických buněk v mléce vyšší. Samotný postup spočívá v nanášení jedné kapky mléka na testovací proužek a třech kapkách aktivačního roztoku. Výsledky se vyhodnocují 45 minut po nanášení aktivačního roztoku na testovací proužek buď vizuálně přiložením k barevné škále.

Součástí sady je i malý digitální přístroj pro odečet počtu somatických buněk. Po zapnutí přístroje se počká na načtení kódu, který se projeví na displeji jako hodnota 549. Poté vložíme dle návodu zkušební testovací proužek reagenčním polštářkem, který je modře zbarvený, na snímač. Poté můžeme měřit testovací proužky se vzorky, rovněž po uplynutí 45 minut (NÁVODY).



Obrázek 3: Testovací proužky, reagentie a návody k *The Porta SCC milk test* (<http://www.portacheck.com/portasc.php>)

- *The Porta SCC quick test* - Princip testu je shodný s předešlou metodou. Rozdíl spočívá pouze v době vyhodnocení, která u tohoto testu je pět minut a dávce činidla a vzorku mléka, které v tomto případě tvoří čtyři kapky vzorku a čtyři kapky činidla (NÁVODY).



Obrázek 4: Testovací proužky, reagentie, pipety a barevná škála pro vizuální odhad počtu somatických buněk u *The Porta SCC quick test* (<http://www.portacheck.com/portasc.php>)

- *Udder check test* – Jedná se o testovací proužky s reagenčním polštářkem, na kterém je nanesen imobilizovaný substrát L-laktátu. V důsledku řady enzymatických reakcí se tento substrát oxiduje na laktát dehydrogenázy (LDH), který je obsažen v mléce, současně indikátor nitotetrazolium, který má modré zbarvení je redukován na fialově zbarvený formazan. Intenzita zbarvení formazanu je poté přímo úměrná koncentraci laktátu dehydrogenázy obsažené v mléce.

Tyto testy nesmějí přijít do kontaktu s přímým slunečním světlem. Využívají se pro čerstvě nadojené mléko nebo pro chlazené mléko, které je následně ohřáno na pokojovou teplotu před testováním. Vždy se využívá mléko, do kterého nebyly přidány konzervační látky. Vzorky je dále nutno promíchat, v případě, že stály déle než 10 minut před provedením testu. V případě, že testovaný vzorek obsahuje mlezivo, čtení barevné reakce je obtížnější. Čím je barva formazanu na reagenčním polštářku tmavší, tím vyšší je koncentrace laktátu dehydrogenázy v mléce, což ukazuje na vyšší pravděpodobnost infekce.

Samotný postup je velmi jednoduchý. Stačí ponořit testovací proužek s detekčním polštářkem do vzorku mléka, které je čerstvě nadojené nebo zchlazené a následně ohřáté na pokojovou teplotu. Po dvou minutách přiložíme testovací proužek ke škále a odečítáme hodnoty (NÁVODY)

Tabulka 1: Interpretace výsledků aktivity LDH (NÁVODY)

Výsledek na barevné škále	Pravděpodobnost infekce	Aktivita LDH
-	nízká	$\leq 100 \text{ U} \cdot \text{l}^{-1}$
+	mírná	$100 - 200 \text{ U} \cdot \text{l}^{-1}$
++	vysoká	$200 - 500 \text{ U} \cdot \text{l}^{-1}$
+++	velmi vysoká	$\geq 500 \text{ U} \cdot \text{l}^{-1}$



Obrázek 5: Testovací proužky pro The Potra SCC milk test po nanesení vzorku mléka a reagentie a po uplynutí 45 minut (nahore), testovací proužky s reagenčním polštářkem The Udder check test poté, co byly ponořeny do mléka a uplynutí 2 minut (dole)

4.2.2 Chemická analýza mléka

- *pH* – hodnota pH byla měřena za pomoci digitálního pH metru WTW pH 95.
- *titrační kyselost* – byla stanovena pomocí metody Soxhlet – Henkela. Je dána spotřebou odměrného roztoku 0,25 M NaOH, který je potřebný k neutralizaci všech kyselých reagujících složek na indikátor fenolftalein ve 100 ml mléka (GAJDŮŠEK, 1997).

Postup této metody byl následující. K 50 ml napipetovaného mléka byly přidány 2 ml indikátoru fenolftaleinu. Načež byla provedena titrace odměrným roztokem, který byl přidáván až do změny barvy mléka z bílé na slabě růžovou trávající po dobu minimálně 15 sekund, srovnatelnou oproti standardu. °SH byly poté určeny dle rovnice.

$$^{\circ}SH = 2 \times a \times f$$

Kde a je spotřeba odměrného činidla v ml a f představuje faktor odměrného roztoku.

4.3 Zpracování výsledků

Výsledky jednotlivých rozborů byly následně statisticky zpracovány. Hodnoty naměřené v laboratoři Mendelovy univerzity byly zjištěné pomocí The Porta SCC milk test a The Porta quick test porovnávány s hodnotami naměřenými akreditovanou laboratoří pro rozbor mléka. U vzorků se zároveň statisticky stanovovalo, zda se od sebe statisticky významně liší hodnoty počtu somatických buněk v mléce, ze kterého byly odstředěny somatické buňky i mléka, ze kterého somatické buňky odstředěny nebyly. Bylo zjišťováno, zda se od sebe hodnoty stanovené v laboratoři Mendelovy univerzity významně statisticky liší od hodnot naměřených v akreditované laboratoři. K tomuto stanovení byl použit dvouvýběrový t-test.

Korelace mezi aktivitou laktátu dehydrogenázy zjištěnou z Udder check testu a počtem somatických buněk byla stanovena pomocí Spearmanova korelačního koeficientu. Statisticky se stanovovalo, zda je aktivita nezávislá na počtu somatických buněk. Dále se u aktivity laktát dehydrogenázy stanovovalo, pomocí dvouvýběrového t-testu, zda se statisticky významně liší hodnoty u odstředěného a neodstředěného mléka. Dále se dvouvýběrovým t-testem stanovovalo, zda se od sebe vzájemně statisticky významně liší hodnoty získané měřením na digitálním přístroji, který byl součástí sady The Porta SCC milk test, od výsledků hodnot počtu somatických buněk získaných z akreditované laboratoře.

Všechny analýzy byly provedeny v operačním programu Statistika 12. Grafy a tabulky byly zpracovány v operačním programu Excel.

5 VÝSLEDKY

V diplomové práci byly sledovány chemické parametry, obsah enzymů a počet somatických buněk v období 2013 – 2015. Pro analýzu byly použity testy The Porta SCC milk test, The Porta quick test a Udder quick test, které byly popsány v kapitole Materiál a metodika. Dále bylo stanovováno pH a °SH, u kterých je detailní postup popsán rovněž v kapitole Materiál a metodika.

Výsledky byly měřeny u kravského syrového mléka, a to jednak u mléka, ze kterého byly odstředěny somatické buňky a u mléka, ze kterého somatické buňky odstředěny nebyly. Naměřené výsledky jsou uvedeny v následujících tabulkách 2 – 15-

Tabulka 2: Počty somatických buněk a aktivita laktátu dehydrogenázy ve vzorcích mléka, ze kterého byly odstředěny somatické buňky z 5. listopadu 2013

Číslo vzorku	The Porta SCC milk test vizuál [10 ³ buněk. ml ⁻¹]	The Porta SCC quick test [10 ³ buněk. ml ⁻¹]	Udder check test [10 ³ buněk. ml ⁻¹]	PSB z centrální laboratoře [10 ³ buněk. ml ⁻¹]
1	<100	<100	100 – 200	10
2	<100	<100	100 – 200	5
3	<100	<100	100 – 200	5
4	<100	<100	<100	1
5	<100	<100	<100	5
6	<100	<100	<100	2
7	<100	<100	100 – 200 / 200 – 500	82
8	<100	<100	100 – 200	14
9	<100	<100	100 – 200	23
10	<100	<100	100 – 200 / 200 – 500	62
11	250	250	200 – 500	213
12	<100	<100	100 – 200	58

Tabulka 3: Naměřené hodnoty mléka, ze kterého nebyly odstředěny somatické buňky z 5. listopadu 2013

číslo vzorku	pH	°SH	The Porta SCC milk test vizuál [10 ³ buněk. ml ⁻¹]	The Porta quick test [10 ³ buněk. ml ⁻¹]	Udder check test [10 ³ buněk. ml ⁻¹]	PSB z akreditované laboratoře [10 ³ buněk. ml ⁻¹]
1	6,72	6,03	<100	<100	100 – 200	14
2	6,73	6,03	<100	<100	100 – 200	14
3	6,56	9,31	<100	<100	100 – 200	7
4	6,57	8,77	<100	<100	<100	2
5	6,66	7,12	<100	<100	<100	7
6	6,67	7,12	<100	<100	<100 / 100 – 200	3
7	6,54	10,41	<100	<100	200 – 500	126
8	6,71	6,56	<100	<100	100 – 200	89
9	6,67	7,12	<100	<100	100 – 200	71
10	6,77	6,03	250	250	200 – 500	275
11	6,63	7,94	1550	750	>500	2324
12	6,67	7,67	250	250	100 – 200	237

Tabulka 4: Naměřené hodnoty mléka, ze kterého nebyly odstředěny somatické buňky z 18. listopadu 2013

číslo vzorku	pH	°SH	The Porta quick test [10 ³ buněk. ml ⁻¹]	Udder check test [10 ³ buněk. ml ⁻¹]	PSB z akreditované laboratoře [10 ³ buněk. ml ⁻¹]
1	7,11	3,84	250	>500	388
2	6,71	5,48	<100	100 – 200	641
3	6,97	4,93	500 – 750	200 – 500/ >500	1502
4	6,63	8,08	<100	<100	80
5	6,65	7,07	<100	100 – 200	30
6	7,27	2,52	750	>500	1047
7	6,74	7,58	<100	100 – 200	13
8	6,74	5,55	<100	200 – 500	247
9	6,72	6,56	<100	100 – 200	2
10	7,00	4,04	250	200 – 500	256
11	6,69	7,07	100 – 250	100 – 200/ 200 – 500	241
12	6,72	6,56	<100	100 – 200	13

Tabulka 5: Naměřené hodnoty mléka, ze kterého byly odstředěny somatické buňky z 18. listopadu 2013

číslo vzorku	The Porta quick test [10 ³ buněk. ml ⁻¹]	Udder check test [10 ³ buněk. ml ⁻¹]
1	250	>500
2	<100	100 – 200
3	500 – 750	200 – 500/ >500
4	<100	<100
5	<100	100 – 200
6	750	>500
7	<100	100 – 200
8	<100	200 – 500
9	<100	100 – 200
10	250	200 – 500
11	100 – 250	100 – 200/ 200 – 500
12	<100	100 – 200

Tabulka 6: Naměřené hodnoty mléka, ze kterého nebyly odstředěny somatické buňky z 26. listopadu 2013

číslo vzorku	pH	°SH	The Porta SCC milk test [10 ³ buněk. ml ⁻¹]	The Porta quick test [10 ³ buněk. ml ⁻¹]	Udder check test [10 ³ buněk. ml ⁻¹]	PSB z akreditované laboratoře [10 ³ buněk. ml ⁻¹]
1	6,75	6,15	<100	<100	100 – 200	17
2	6,78	6,05	<100	<100	100 – 200/ 200- 500	26
3	6,59	7,99	<100	<100	100 – 200	13
4	6,60	7,79	<100	<100	<100	7
5	6,68	7,28	<100	<100	100 – 200	8
6	6,72	6,77	<100	<100	100 – 200	18
7	6,66	7,28	<100	<100	100 – 200	65
8	6,75	5,64	<100	<100	200 – 500	42
9	6,67	6,97	<100	<100	100 – 200	29
10	6,79	5,54	<100	<100	200 – 500	41
11	6,65	7,18	1550	250	>500	2482
12	6,71	6,56	250	<100	100 – 200	249

Tabulka 7: Naměřené hodnoty mléka, ze kterého nebyly odstředěny somatické buňky z 26. listopadu 2013

číslo vzorku	The Porta SCC milk test [10^3 buněk. ml $^{-1}$]	The Porta quick test [10^3 buněk. ml $^{-1}$]	Udder check test [10^3 buněk. ml $^{-1}$]
1	<100	<100	100 – 200
2	<100	<100	100 – 200 / 200 – 500
3	<100	<100	100 – 200
4	<100	<100	<100
5	<100	<100	100 – 200
6	<100	<100	100 – 200
7	<100	<100	100 – 200
8	<100	100 – 250	100 – 200
9	<100	<100	100 – 200
10	<100	<100	100 – 200 / 200 – 500
11	750	250 – 500	200 – 500
12	250	250	100 – 200

Tabulka 8: Naměřené hodnoty mléka ze kterého nebyly odstředěny somatické buňky z 8. října 2014

číslo vzorku	pH	°SH	The Porta quick test (v tisících [10^3 buněk. ml $^{-1}$])	Udder check test [10^3 buněk. ml $^{-1}$]	PSB z akreditované laboratoře [10^3 buněk. ml $^{-1}$]
1	6,60	6,11	100 – 250	200 – 500	990
2	6,70	6,48	<100	100 – 200	109
3	6,66	6,58	100 – 250	100 – 200	115
4	6,70	6,82	250	200 – 500	175
5	6,65	6,58	<100	100 – 200	16
6	6,65	6,68	100 – 250	100 – 200 / 200 – 500	156

Tabulka 9: Naměřené hodnoty mléka, ze kterého byly odstředěny somatické buňky z 8. října 2014

číslo vzorku	The Porta quick test [10 ³ buněk. ml ⁻¹]	Udder check test [10 ³ buněk. ml ⁻¹]
1	100 – 250	200 – 500
2	<100	100 – 200
3	<100	100 – 200
4	100 – 250	200 – 500
5	<100	100 – 200
6	100 – 250	100 – 200 / 200 – 500

Tabulka 10: Naměřené hodnoty mléka, ze kterého nebyly odstředěny somatické buňky z 14. ledna 2015

číslo vzorku	pH	°SH	The Porta SCC milk test [10 ³ buněk. ml ⁻¹]	The Porta quick test [10 ³ buněk. ml ⁻¹]	Udder check test [10 ³ buněk. ml ⁻¹]	PSB z akreditované laboratoře [10 ³ buněk. ml ⁻¹]
1	6,65	7,53	250	250	100 – 200	122
2	6,63	7,74	100 – 250	250	100 – 200	155
3	6,72	6,91	<100	100/ 250	200 – 500	128
4	6,75	7,64	100 – 250	100/ 250	100 – 200 / 200 – 500	104
5	6,63	7,95	<100	<100	<100	25
6	6,63	8,16	500	500	200 – 500	180
7	6,63	9,10	250	250	100 – 200	185
8	6,69	7,32	500	500	200 – 500	346
9	6,83	5,65	<100	<100	200 – 500	78
10	6,77	6,91	<100	<100	<100	28

Tabulka 11: Naměřené hodnoty mléka, ze kterého byly odstředěny somatické buňky z 14. ledna 2015

číslo vzorku	The Porta SCC milk test [10^3 buněk. ml $^{-1}$]	The Porta quick test [10^3 buněk. ml $^{-1}$]	Udder check test [10^3 buněk. ml $^{-1}$]
1	<100	<100	100 – 200
2	<100	<100	100 – 200
3	<100	<100	200 – 500
4	<100	<100	100 – 200
5	<100	<100	<100
6	100 – 250	250	200 – 500
7	<100	<100	100 – 200
8	<100	250	100 – 200
9	<100	<100	200 – 500
10	<100	<100	<100

Tabulka 12: Naměřené hodnoty mléka, ze kterého nebyly odstředěny somatické buňky z 20. ledna 2015

číslo vzorku	pH	°SH	The Porta SCC milk test [10^3 buněk. ml $^{-1}$]	The Porta quick test (v tisících buněk. ml $^{-1}$)	Udder check test [10^3 buněk. ml $^{-1}$]	PSB z akreditované laboratoře [10^3 buněk. ml $^{-1}$]
1	6,76	5,86	<100	<100	100 – 200	127
2	6,62	7,85	<100	<100	<100	17
3	7,08	3,14	750	500 – 750	>500	469
4	6,69	6,39	500	250	100 – 200 / 200 – 500	117
5	6,69	7,23	<100	<100	100 – 200	40
6	6,61	7,02	<100	<100	<100	25
7	6,58	8,38	100 – 250	100 – 250	100 – 200	59
8	6,75	6,49	250 – 500	250 – 500	100 – 200 / 200 – 500	124
9	6,69	7,43	250	250	100 – 200	89
10	6,71	6,39	<100	<100	<100	24

Tabulka 13: Naměřené hodnoty mléka, ze kterého byly odstředěny somatické buňky z 20. ledna 2015

číslo vzorku	The Porta SCC milk test [10^3 buněk. ml $^{-1}$]	The Porta quick test [10^3 buněk. ml $^{-1}$]	Udder check test [10^3 buněk. ml $^{-1}$]
1	100 – 250	<100	100 – 200
2	<100	<100	<100
3	500	250 – 500	>500
4	250	100 – 250	100 – 200 / 200 – 500
5	<100	<100	100 – 200
6	<100	<100	<100
7	<100	<100	100 – 200
8	<100	250	100 – 200 / 200 – 500
9	<100	100 – 250	100 – 200
10	<100	<100	<100

Tabulka 14: Naměřené hodnoty mléka, ze kterého nebyly odstředěny somatické buňky z 23. ledna 2015

číslo vzorku	pH	°SH	The Porta SCC milk test [10^3 buněk. ml $^{-1}$]	The Porta quick test [10^3 buněk. ml $^{-1}$]	Udder check test [10^3 buněk. ml $^{-1}$]	PSB z akreditované laboratoře [10^3 buněk. ml $^{-1}$]
1	6,57	6,49	<100	<100	<100	58
2	6,57	7,33	<100	<100	<100	11
3	6,63	7,96	<100	<100	<100	26
4	6,54	7,22	<100	<100	<100	7
5	6,67	6,60	<100	250	100 – 250	147
6	6,67	6,86	<100	100 – 250	<100	79
7	6,56	8,69	<100	<100	<100	43
8	6,62	7,02	250	<100	<100	11
9	6,64	6,70	<100	100 – 250	100 – 200	309
10	6,56	8,48	<100	100 – 250	<100	86

Tabulka 15: Naměřené hodnoty mléka, ze kterého byly odstředěny somatické buňky z 23. ledna 2015

číslo vzorku	The Porta SCC milk test [10^3 buněk. ml $^{-1}$]	The Porta quick test [10^3 buněk. ml $^{-1}$]	Udder check test [10^3 buněk. ml $^{-1}$]
1	<100	<100	<100
2	<100	<100	<100
3	<100	<100	<100
4	<100	<100	<100
5	<100	<100	<100
6	<100	<100	<100
7	<100	<100	<100
8	<100	<100	<100
9	250	250	100 – 200
10	<100	<100	<100

6 DISKUZE

Počty somatických buněk odhadnutých vizuálně na The Porta SCC milk testu v syrovém mléce, ze kterého nebyly odstředěny somatické buňky, se statisticky významně nelišily od hodnot naměřených akreditovanou laboratoří ($p > 0,05$), což dokazuje, že aktivita enzymů se s počtem somatických buněk zvyšuje (NÁVODY). Dané testy jsou tedy schopny ověřit orientační počty somatických buněk.

Naproti tomu hodnoty naměřené na digitálním přístroji se nejevily jako průkazné v porovnání s výsledky hodnot počtu somatických buněk naměřených v akreditované laboratoři. Z tohoto důvodu nejsou ani tyto výsledky zaneseny do tabulek. Možnou příčinou je pravděpodobně nízké rozlišení přístroje. Přístroj detekoval až hodnoty vyšší než 400 000 somatických buněk v 1 ml. Což vzhledem k faktu, že v České republice je norma pro zdravé mléko jen do 100 000 somatických buněk v 1 ml mléka (STUHR a kol., 2013) není příliš vhodná metoda, jelikož u mastitidního mléka, které obsahuje somatické buňky v rozmezí 100 000 – 400 000 vůbec neregistruje počet somatických buněk.

Počty somatických buněk z měření The Porta SCC quick testem se rovněž statisticky významně nelišily od hodnot, které byly stanoveny v akreditované laboratoři ($p > 0,05$), což jen opět dokazuje, že aktivita enzymů je úměrná počtu somatických buněk. Ačkoli se jednalo jak v případě The Porta SCC quick test, tak v případě The

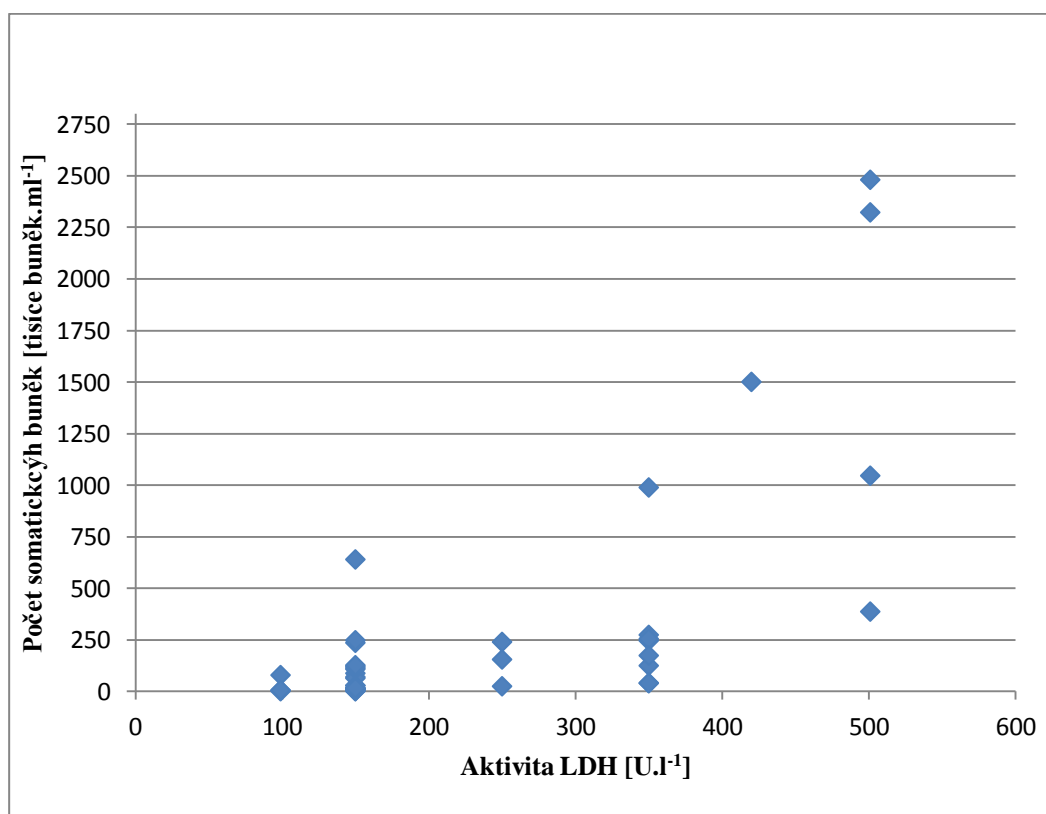
Porta SCC mik test o odhad počtu somatických buněk na základě barevné škály, korespondoval tento odhad s počtem somatických buněk naměřených v akreditované laboratoři.

Dále bylo potvrzeno, že aktivita laktát dehydrogenázy je v silné korelaci s počtem somatických buněk ($p > 0,05$).

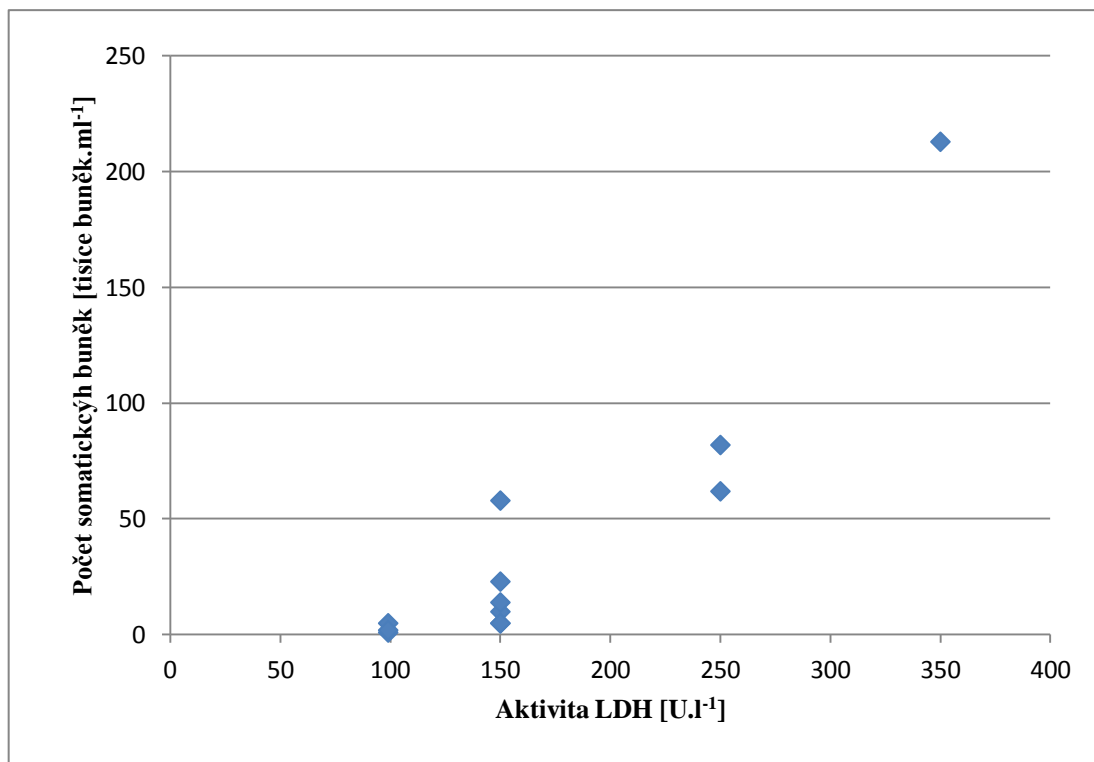
FORSBÄCK a kol., 2009 prokazuje korelaci mezi koncentrací a aktivitou enzymů se zvyšujícím se počtem somatických buněk v mléce krav. Čemuž odpovídá i náš výsledek diplomové práce.

Při infekci mléčné žlázy dochází k uvolnění enzymů včetně LDH do mléka, jak bylo zmíněno již dříve, v důsledku odpovědi imunitního systému. Čím je těžší infekce, tím je hladina LDH vyšší. LDH byl prokázán jako významný marker pro sledování mastitidy. Koncentrace laktát dehydrogenázy koreluje s počtem somatických buněk (NÁVODY).

Uvedené výsledky našeho měření potvrzují i grafy (obrázek 6 a obrázek 7), kde je znázorněna aktivita enzymu LDH v mléce krav a počet somatických buněk.



Obrázek 6: Graf znázorňující aktivitu LDH a počet somatických buněk v mléce, ze kterého nebyly odstředěny somatické buňky (hodnoty počtu somatických buněk pocházejí z měření z akreditované laboratoře)



Obrázek 6: Graf znázorňující aktivitu LDH a počet somatických buněk v mléce, ze kterého byly odstředěny somatické buňky (hodnoty počtu somatických buněk pocházejí z měření z akreditované laboratoře)

Zvýšení koncentrace laktátu dehydrogenázy nastává často ještě před samotným zvýšením počtu somatických buněk v mléce, díky čemuž lze provést včasnou diagnostiku (NÁVODY).

CHAGUNDA a kol., 2006 rovněž prokázali vzájemný vztah mezi aktivitou laktát dehydrogenázy a počtem somatických buněk v kravském mléce. Korelace byla výraznější u vyšších hodnot počtu somatických buněk, což souhlasí i s našimi výsledky. LIQUAN a kol., 2006 prokázali, že korelace mezi řadou testovaných enzymů, mezi kterými byla i LDH, a počtem somatických buněk je nejvyšší korelace u LDH.

Dále CHAGUNDA a kol., 2006 prokázali, že laktát dehydrogenázy je velmi citlivým parametrem pro detekci subklinických mastitid. U zdravých dojnic nebo u dojnic s nízkým počtem somatických buněk se zvýšení aktivity laktát dehydrogenázy naopak nijak neprojevuje (LEHMAN a kol., 2014), což rovněž odpovídá našim sledováním.

FRIGGENS a kol., 2007 prokázal, že LDH může být přesný ukazatel mastitidy. Stejně tak ve studii, kterou provedl FORSBÄCK a kol., 2009, což se potvrdilo i našim měřením.

Cílem diplomové práce bylo rovněž posoudit, zda se odstředím somatických buněk z mléka, výrazně sníží aktivita enzymů v mléce. Nebylo prokázáno, že by se odstředěním mléka průkazně snížila tato aktivita, která by odpovídala počtu somatických buněk u testů The Porta SCC milk test a The Porta SCC quick test.

Hodnoty získané pomocí odhadu na The Porta SCC mik test u mléka, ze kterého byly odstředěny somatické buňky i u mléka, ze kterého somatické buňky odstředěny nebyly, se statisticky významně nelišily ($p > 0,05$). Rovněž se od sebe statisticky významně nelišily hodnoty odstředěného a neodstředěného mléka u testu The Porta SCC quick test.

Hodnoty zjištěné aktivity laktát dehydrogenázy v neodstředěném a odstředěném mléce se statisticky významně neliší ($p > 0,05$). To znamená, že by tento test mohl být použit pro detekci mléka, ze kterého byly somatické buňky odstředěny.

V posledních letech se vyskytuje, že chovatelé na zemědělských farmách se somatické buňky odstředí na speciálních odstředivkách a takto upravené mléko posílají do mlékáren. Běžně používané testy sledované v centrálních laboratořích sledují jenom somatické buňky a nikoli obsah enzymů. Z mnoha studií je zřejmé, že vysoký počet somatických buněk negativně ovlivňuje technologickou kvalitu mléka (syřitelnost, tepelnou stabilitu mléka, kysací schopnost) a následně se poté negativně promítají na technologické procesy zpracování mléka v mlékárnách (snížení výtěžnosti sýrů, tendenci mléka se srážet během záhřevu).

V posledních letech se objevují snahy ze strany některých prvovýrobců mléka odstředit somatické buňky z mléka na speciálních odstředivkách a tím si takto „zlepšit“ kvalitu nakupovaného mléka do mlékáren. Dosavadní praxe zjišťovala případné poruchy zdravotního stavu pouze na základě sledování počtu somatických buněk v mléce a neumožňovala rychle detekovat takto „falšované“ mléko. Naše práce ukazuje na možnost využití testů The Porta SCC milk , The Porta quick test a Udder quick na rychlou detekci mléka s původně vysokým počtem somatických buněk a umožňuje tedy i zachycení mléka, ze kterého byly somatické buňky odstředěny.

7 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo zaměřit se na prostudování specifikace somatických buněk v mléce kravském, ovčím a kozím. Dále prostudovat charakteristiku somatických buněk a vliv mastitidy na složení mléka a jeho vlastnosti. Dále se diplomová práce zaměřila na možnosti detekce mastitid či zvýšeného počtu somatických buněk na základě aktivity enzymů.

Mastitida způsobuje významné ekonomické ztráty v produkci mléka. Její rozdělení je velmi variabilní. Nejčastěji se dělí na kontagiózní mastitidu, tedy takovou, jejíž příčina je způsobena narušením rovnováhy mezi mikroorganismy, které se již přirozeně nacházejí v mléčné žláze, a environmentální. Environmentální mastitida je zapříčiněna průnikem mikroorganismů, které se vyskytují v prostředí a které přes strukový kanálek proniknou do mléčné žlázy, kde vyvolají zánět.

Nejnámější členění mastitidy je rozdělení na klinickou a subklinickou formu tohoto onemocnění. Klinická forma je zřejmá, její příznaky jsou jasné a patrné. Významnější problém nastává v případě subklinické formy mastitidy, která se navenek neprojevuje a pokud ano, jsou její příznaky nespecifické.

Nespecifickými příznaky subklinické formy mastitidy je pokles dojivosti, zvýšení počtu somatických buněk, změny v mléce. Během mastitidy dochází k nárůstu enzymatické aktivity mléka. Dochází k poklesu vápníku v krvi, dále k poklesu kaseinových frakcí bílkovin v mléce, degradaci kaseinu a naopak nárůstu syrovátkových bílkovin. Dále dochází v důsledku mikrobiální lipolýzy ke zvýšení obsahu volných mastných kyselin v mléce. Obsah sodíku a draslíku je významně zvýšen, naopak obsah laktózy klesá.

Z důvodů sníženého poklesu dojivosti a vyřazení mléka od dojnic produkující mastitidní mléko je vyvíjena snaha o včasnou detekci subklinické formy mastitidy. Metod detekce mastitid je nepřeborná řada.

Mezi nejvýznamnější a stále nejvíce používané metody se řadí počet somatických buněk v 1 ml mléka. Počet somatických buněk je průkazná metoda, jelikož v důsledku mastitidy dochází k jejich významnému zvýšení. Po průniku mikroorganismů do mléčné žlázy je v důsledku imunitní odpovědi navýšen počet leukocytů, které se s patogenními mikroorganismy snaží vypořádat. Limit pro počet somatických buněk v 1 ml mléka pocházející od zdravé dojnice je stanoven na 100 000. Top kvalitu vykazují dojnice

s počtem 50 000 somatických buněk v 1 ml mléka. Fyziologická hranice u ovcí je stanovena do počtu 500 000 somatických buněk v 1 ml mléka. Počet somatických buněk u koz je v porovnání s počty somatických buněk v mléce ovcí a krav podstatně vyšší, jelikož počet somatických buněk je v mléce koz více ovlivněn fyziologickými faktory než u krav. Z tohoto důvodu zde nemohou platit normy pro počet somatických buněk jako u krav.

Nověji se začínají v praxi používat metody detekující u mastitidního mléka vyšší aktivitu enzymů. Mezi nejvýznamnější parametry pro detekci subklinické formy mastitidy se řadí enzymy, jakými jsou laktát dehydrogenázy, Nagasse, plazmin, laktoferin, β -glukuronidáza a alkalická fosfatáza. Detekce pomocí katalázy a amylázy ustupuje do pozadí.

V diplomové práci bylo použito pro detekci počtu somatických buněk v syrovém mléce krav The Porta SCC milk test, The Porta quick test a Udder quick test. Všechny tyto testy byly použity u mléka, ze kterého nebyly odstředěny somatické buňky i u mléka ze kterého somatické buňky odstředěny byly. Součástí sady The Porta SCC milk byl i elektronický přístroj pro odečet počtu somatických buněk, který ovšem, zjevně kvůli nízkému prahu rozlišení, nebyl použit pro další měření. U testů The Porta SCC mik test a The Porta quick test se jednalo o vizuální odečet odhadovaného počtu somatických buněk dle přiložené barevné škály.

The Porta SCC milk test je založen na chemické reakci mezi barvivem, které je nanášeno na testovací proužek, a enzymem, který detekuje somatické buňky v mléce. V přítomnosti somatických buněk v mléce dochází ke změně barvy testovacího proužku z bezbarvé na modrou. Čím je barva tmavší, tím je výskyt somatických buněk v mléce vyšší. Samotný postup spočívá v nanášení jedné kapky mléka na testovací proužek a třech kapkách aktivačního roztoku. Výsledky se vyhodnocují 45 minut po nanášení aktivačního roztoku na testovací proužek buď vizuálně přiložením k barevné škále.

Princip The Porta SCC quick test je shodný s předešlou metodou. Rozdíl spočívá pouze v době vyhodnocení, která u tohoto testu je pět minut a dávkou činidla a vzorku mléka, které v tomto případě tvoří čtyři kapky vzorku a čtyři kapky činidla

U testu Udder quick se vizuálně hodnotila aktivita enzymu laktát dehydrogenázy pomocí testovacího proužku s reagenčním polštářkem obsahující imobilizovaný substrát L-laktátu. V důsledku řady enzymatických reakcí se tento substrát oxiduje na laktát dehydrogenázy (LDH), který je obsažen v mléce, současně indikátor nitotetrazolium, který má modré zbarvení je redukován na fialově zbarvený formazan. Intenzita

zabarvení formazanu je poté přímo úměrná koncentraci laktátu dehydrogenázy obsažené v mléce.

Naměřené hodnoty poté byly porovnány s hodnotami somatických buněk, které byly stanoveny v akreditované laboratoři. Výsledky byly testovány, zda existuje významný statistický rozdíl mezi hodnotami naměřenými v laboratoři ústavu technologie potravin Mendelovy univerzity v Brně a výsledky zjištěnými v akreditované laboratoři. Hodnotilo se, zda existuje statisticky průkazný rozdíl mezi hodnotami u mléka, ze kterého byly odstředěny somatické buňky a mléka, ze kterého somatické buňky odstředěny nebyly. Tyto hypotézy se testovaly pomocí dvouvýběrového t-testu. Dále se hodnotilo, zda existuje korelace mezi aktivitou LDH a počtem somatických buněk pomocí Spearmanova korelačního koeficientu.

Výsledky prokázaly, že neexistuje statisticky významný rozdíl mezi hodnotami našeho měření a výsledky z akreditované laboratoře a ani hodnoty měřené u mléka, ze kterého byly somatické buňky odstředěny, se statisticky významně nelišily od hodnot měřených u mléka, ze kterého nebyly somatické buňky odstředěny. Dále se prokázalo, že aktivita LDH závisí na počtu somatických buněk. Se zvyšujícím se počtem somatických buněk dochází k nárůstu aktivity LDH.

V posledních letech se vyskytují případy, kdy chovatelé na zemědělských farmách somatické buňky odstředí na speciálních odstředivkách a takto upravené mléko posílají do mlékáren. Běžně používané testy sledované v centrálních laboratořích sledují jenom somatické buňky a nikoli obsah enzymů. Z mnoha studií je zřejmé, že vysoký počet somatických buněk negativně ovlivňuje technologickou kvalitu mléka (sýřitelnost, tepelnou stabilitu mléka, kysací schopnost) a následně se poté negativně promítají do technologických procesů zpracování mléka v mlékárnách (snížení výtěžnosti sýrů, tendenci mléka se srážet během záhřevu).

Dosavadní praxe neumožňuje rychle detekovat takto „falšované“ mléko. Naše práce ukazuje na možnost využití testů The Porta SCC milk test. The Porta quick test a Udder quick na rychlou detekci mléka s původně vysokým počtem somatických buněk a umožňuje tedy i zachycení mléka, ze kterého byly somatické buňky odstředěny.

8 SEZNAM LITERATURY

ASHLEY, J., LI, S., F., 2013: An aptamer based surface plasmon resonance biosensor for the detection of bovine katalase in milk. *Biosensors and Bioelectronics*, 48, s. 126 – 131.

BARKEFORS, I., LE, J., S., JAKOBSSON, L., HEJLL, E., CARLSON, G., JAOHANSSON, H., JARVIUS, J., PARK, J., W., JEON, N., L., KREUGER, J., :2008: Endothelial cell migration in stable gradient of VEGFA and FGF2: Effects on chemotaxis and chemokinesis. *Journal of Biological Chemistry*, dostupné na: <http://www.jbc.org/content/283/20/13905>, citováno: [2015-03-27].

BASTIAN, E., D., BROWN, R., J., 1996: Plasmin in milk and dairy products: an update, *International Dairy Journal*, 6 (5), s. 435 – 457.

BORDIN, G., CORDERIO RAPOSO, F., DE LA CALLE, B., RODRIGUET, A., R., 2001: Identification and quantification of major bovine milk proteins by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 928 (1), s. 63 – 76.

BUCEK, 9., 2011: *Využití somatických buněk ve šlechtění skotu*. *Veterinářství*, 60 (1), s. 43 – 48.

BUCEK, P., 2010: *Vybrané problémy šlechtění na odolnost ke klinickým mastitidám – review*. *Veterinářství*, 60 (1), s. 19 – 23.

BZDIL, J., 2012: *Prevalence vybraných patogenů mléčné žlázy skotu v letech 2000 – 2010*. *Veterinářství*, 62 (1), s. 28 – 32.

BZDIL, J., 2011: *Sezónnost výskytu vybraných patogenů mléčné žlázy skotu*. *Veterinářství*, 60 (1), s. 38 – 42.

CORTELLION, G., LOCCI, F., RAMPILLI, M., 2006: An investigation of the plasmin-plasminogen system in caprine milk and cheese. *International Dairy Journal*, 16 (6), s. 619 – 622.

ČSN EN ISO 12366 – 2:2007, dostupné na: <http://www.cmsch.cz/rozbor-y-kontroly-uzitkovosti/#sb> , citováno: [2015-03-15].

DA SILVA, I., S., RICHTER, E., M., DO LAGO, C., L., GUTZ, I., G., R., TANAKA, A., A., AGNES, L., 2005: FIA-potenciometry in the sub-Nernstia response region for rapid and direkt chloride in milk and in coconut water. *Talanta*, 67 (3), s. 651 – 657.

DE OLIVY, A., M., DÍAZ, J., R., MOLINA, M., P., PERIS., C., 2013: Quantification of milk Šeld and composition changes as affected by subclinical mastitis during the current lactation in sheep. *Journal of Dairy Science*, 96 (12), s. 7698 – 7708.

DE VLIEGHER, S., FOX, L., K., PIEPERS, S., MCDUGALL, S., BARKEMA, H., W., 2012: Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, prevention, and control, *Journal of Dairy Science*, 95 (3), s. 1025 – 1040.

FERRERO, F., J., VALLEDOR., M., CAMPO, J., C., 2014: Screening method for early detection of mastitis in cows. *Measurement*. 47, s. 855 – 860.

FLEISCHER, P., MÁTLOVÁ, V., SKŘIVÁNEK, M., ŠLOSÁRKOVÁ, S., 2012: Zdravotní problematika, s. 184 – 208, In. FANTOVÁ, M., FLEISCHER, P., (eds), 2012: *Chov koz*. Brázda, Praha, 232 s. ISBN: 978-80-209-0393-8.

FORSBÄCK, L., LINDMARK – MÄNSSON, H., ANDRÉN, A., SVENNERSTEN – SJAUNJA, K., 2009: Evaluation of quality ganges in udder milk from cows with low – to – moderate somatic cell counts. *Animal*, 4 (4), s. 617 – 626.

FOX, P., F., KELLY, A., 2006: Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects-Part 1. *International Dairy Journal*, 16 (6), s. 500 – 516.

FOX, P., F., KELLY, A., 2006: Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects-Part 2. *International Dairy Journal*, 16 (6), s. 517 – 532.

FOX, P., F., MCSWEENEY, P., L., H., 1998: *Dairy chemistry and biochemistry*, London, Blackie Academic & Professional, 478 s. ISBN 0-412-72000-0.

FRIGGENS, N., C., CHAGUNDA, M., G., G., BJERRING, M., RIDDER, C., HOJSGAARD, S., LARSEN, T., 2007: Estimating Degree of Mastitis from Time-Series Measurements in Milk: A Test of Model Based on Lactate Dehydrogenase Measurement. *Journal of Dairy Science*, 90 (12), s. 5415 – 5427.

FUTO, P., MARKUS, G., KISS, A., ADÁNYI, N., 2012: Development of Catalase-Based Amperometric Biosensor for the Determination of Increased Catalase Content in Milk Samples. *Electroanalysis*, 24 (1), s. 107 – 113.

GAJDŮŠEK, S., 2003: *Laktologie*, Brno, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 78 s. ISBN 80-7157-657-3.

GAJDŮŠEK, S., 1997: *Mlékařství II. – cvičení*, Brno, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 142 s., ISBN: 80-7157-342-6.

GRÖHL, Y., T., WILSON, D., J., GONZÁLEZ, R., N., HERTL, J., A., SCHULTE, H., BENNETT, G., SCHUKKEN, Y., H., 2004: Effect of Pathogen-Specific Clinical Mastitis on Milk Yield in Dairy, *Journal of Dairy Science*, 87 (10), s. 3358 – 3374.

HANÚŠ, O., VYLETĚLOVÁ, M., GENČUROVÁ, V., 2008: Pasterace a její kontrola jako jeden z nejdůležitějších prvků zjištění bezpečnosti mléčného potravinového trhu- současné aspekty. *Mliekarstvo*, 39, (4), s. 41 – 46.

HISS, S., MEYER, T., SAUERWEIN, H., 2008: Lactoferrin concentrations in goat milk throughout lactation. *Small Ruminant Research*, 80 (1 – 3), s. 87 – 90.

HOGVEEN, H., 2011: Mastitis therapy and kontrol | Automated Online Detection of Abnormal Milk. *Encyclopedia of Dairy Science (Second Edition)*. s. 422 – 428.

HUSSAIN, R., JAVED, M., T., KHAN, A., 2012: Changes in Some Biochemical Parameters and Somatic Cell Counts in the Milk of Buffalo and Cattle Suffering Mastitis. *Pakistan Veterinary Journal*, 32 (3), s. 418 – 421.

HUYBRECHTS, T., MERTENS, K., DE BAERDEMAEKER, J., DE KETELAERE, B., SAEYS, W., 2014: Early warnings from automatic milk yield monitoring with online synergistic control. *Journal of Dairy Science*, 97 (6), s. 3371 – 3381.

CHAGUNDA, M., G., G., FRIGGENS, N., C., RASMUSSEN, M., D., LARSEN., T., 2006: a Model for Detection of Individual Cow Mastitis Based on an Indicator Measured in Milk. *Journal of Dairy Science*, 89 (8), s. 2980 – 2998.

CHAGUNDA, M., G., G., LARSEN, T., BJERRING, M., INGVARSTEN, K., L., 2006: L-lactate dehydrogenase and N-acetyl- β -glucosaminidase activities in bovine milk as indicators of non-specific mastitis. *Journal of Dairy Research*, 73 (4), s. 431 – 440.

CHOVANEC, M., GOLIAN, J., ŠKARBOVÁ, B., SOKOL, J., 2008: Vybrané faktory ovlivňující aktivitu alkalické fosfatázy v mléku. *Mliekarstvo*. 39, (3), s. 46-51.

JAGLIČ, Z., ČERVINKOVÁ, D., VLKOVÁ, H., BABÁK V., LORENCOVÁ, A., SEYDLOVÁ R., 2014: *Prevalence bakteriálních původců subklinických mastitid v České republice*. *Veterinářství*, 64 (2), s. 142 – 145.

JELÍNKVÁ, J., 2012: *Co nám říkají somatické buňky*. *Náš chov*, 12, s. 56 – 58.

JEŽKOVÁ, A. 2014: *Výživa a zdravotní stav mléčné žlázy*. *Náš chov*, 2, s. 71 – 72.

JEŽKOVÁ, A., 2013: *O zdraví mléčné žlázy*. *Náš chov*, 2, s. 49 - 50.

JEŽKOVÁ, A., 2013: *Umíme vyzrát na mastitidu?* *Náš chov*, 8, s. 36 – 38.

JEŽKOVÁ, A., 2014: *Produkce mléka a zdraví vemene dojníc*. *Náš chov*, 2, s. 56 – 58.

KALANTARI, A., SAFI, S., FOROUSHANI, A., R., 2013: Milk lactate dehydrogenase and alkaline phosphatase as biomarkers in detection of bovine subclinical mastitis. *Annals of Biological Research*, 4 (2), s. 302 – 307.

KAMPHANIUS, C., SHERLOCK, R., JAGO, J., MEIN, G., HOGEVEEN, H., 2008: Automatic Detection of Clinical Mastitis Is Improved by In-Line Monitoring of Somatic Cell Count. *Journal of Dairy Science*, 91 (12), s. 4560 – 4570.

KATSOULOS, P., D., CHRISTODOULOPOULOS, G., MINAS, A., KARATZIA, M., A., POURLIOTIS, K., KRITAS, S., K., 2010: The role of lactate dehydrogenase, alkaline phosphate and aspartate aminotransferase in the diagnosis of subclinical intramammary infections in dairy sheep and goats. *Journal of Dairy Research*, 77, s. 107 – 111.

KESTER, H., J., SORTER, D., E., HOGAN, J., S., 2014: Activity and milk compositional changes following experimentally induced *Streptococcus uberis* bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*, dostupné na <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030214008121>, [citované: 2014-11-29]

KOPPERSCHLÄGER, G., KIRCHBERGER, J., 1996: Methods for the separation of lactate dehydrogenases and clinical significance of the enzyme. *Journal of Chromatography B: Biomedical Science and Applications*, 684 (1 – 2), s. 25 – 49.

KOZÁKOVÁ, J., 2013: *Mastitidy jalovic není nikdy snadné léčit*. *Náš chov*, 2, s. 54.

LANGE – CONSIGLIO, A., SPELTA, C., GARLAPP, R., LUINI, M., CREMONESI, F., 2014: *Intramammary administration of platelet concentrate as an unconventional therapy in bovine mastitis: First clinical application*. *Journal of Dairy Science*, 97 (10), s. 6223 – 6230.

LARSEN, T., 2005: Determination of lactate dehydrogenase (LDH) activity in milk by fluorometric assay. *Journal of Dairy Research*, 72, s. 209 – 216.

LARSENA, T., RONTVED, C., M., INGVARTSEN, K., L., VELLS., L., BJERRING, M., 2010: Enzyme activity and acute phase proteins in milk utilized as indicators of acute clinical *E. coli* LPS – induced mastitis. *Animal*, 4 (10), s. 1672 – 1679.

LEHMANN, M., WALL, S., K., WELLNITZ O., BRUCKMAIR, R., M., 2014: Changes in milk L-lactate, lactate dehydrogenase, serum albumin and IgG during milk and their association with somatic cell count. *Journal of Dairy Research*, dostupné na: <http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=9450732&fulltextType=RA&fileId=S002202991400065X>, [citované: 2015-3-23]

LEITNER, G., MERIN, U., SILANIKOVE, N., 2004: Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis na goats. *Journal of Dairy Science*, 87 (6), s. 1719 – 1726.

LIQUANG, H., MINGUA, S., RONGXIANG, C., 2006: Correlation between somatic cell counts and bacteria and enzymes in milk of subclinical mastitis. dostupné na: http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-ZJNY503.006.htm, [citované: 2015-3-23]

LUKÁŠOVÁ, J. a kol. 2008: *Hygiena a technologie produkce mléka*, Praha, Veterinární a farmaceutická univerzita, 101 s., ISBN 80-85114-53-4.

MCDOUGALL, S., MURDOUGH, P., PANKEY, W., DELANEY, C., BARLOW, J., SCRUTON, D., 2001: Relationships among static cell count, California mastitis test, impedance nad bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. *Small Ruminant Research* 40 (3), s. 245 – 254.

MIEKLEY, B., TRAUlsen, I., KRITER, J., 2012: Detection of mastitis and lameness in dairy cows using wavelet analysis. *Livestock Science*, 148 (3), s. 227 – 236.

MOLENAAR, A., J., KUYS, Y., M., DAVIS, S., R., WILKINS, R., J., MEAD, P., E., TWEEDIE, J., W., 1996: Elevation of Lactoferrin Gene Expression in Developing, Ductal, Resting and Regressing Parenchymal Epithelium of the Ruminant Mammary Gland. *Journal of Dairy Science*, 79 (7), s. 1198 – 1208.

NÁVODY K TESTŮM, dostupné na: <http://www.portacheck.com/>, [citované: 2015-03-15].

PAAPE, M., J., WIGGANS, G., R., BANNERMAN, D., D., THOMAS, D., L., SANDER, A., H., CONTRERAS, A., MORONI, P., MILLER, R., H., 2007: Monitoring goat and sheep milk somatic cell counts. *Small Ruminant Research*, 68 (1 – 2), s. 114 – 125.

PARK, Y., W., JUAREZ, M., RAMOS, M., HAENLEIN, G., F., W., 2007: Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68 (1 – 2), s. 88 – 113.

RAYNAL - LJUTOVAC, K., PIRISI, A., DE CRÉMOUX, R., GONZALO, C., 2007: Somatic cell of goat and sheep milk: Analytical, sanitary, productive and technological aspects. *Small Ruminant Research*, 68 (1 – 2), s. 126 – 144.

PEREIRA, U., P., OLIVIERA, D., G., S., MESQUITA, L., R., COSTA, G., M., PEREIRA, L., J., 2011: *Efficacy of Staphylococcus aureus vaccines for bovine mastitis : A systematic review*. *Veterinary Microbiology*, 148 (2 – 4), s. 117 – 124.

PERSSON, Y., OLOFSSON, I., 2011: Direct and indirect measurement of somatic cell count as indicator of intramammary infection in dairy goats. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 53 (15), dostupné na: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1751-0147-53-15.pdf>, [citované: 2014-11-28]

PIEPERS, S., DE MEULEMEESTER, L., KRUIF, A., OPSOMER, G., BARKEMA, H., W., DE VliegHER, S., 2007: Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium. *Journal of Dairy Research*, 74 (4), s. 478 – 483.

RYŠÁNEK, D., 2011: *Imunoprolaxe bovinních mastitid – skutečnost a vize*. *Veterinářství*, 60 (1), s. 14 – 18.

SEYDLOVÁ, R., 2012: *Mezinárodní kongres o zdraví mléčné žlázy*. *Náš chov*, 2, s. 52 – 53.

SEYDLOVÁ, R., 2013: *Zdraví mléčné žlázy prvotetek*. *Náš chov*, 12, s. 52 – 54.

SILANIKOVE, N., SHAPIRO, F., SILANIKOVE, M., MERIN, U., LEITNER, G., 2009: Hydrogen Peroxide-Dependent Conversion of Nitrite to Nitrate as a Crucial Feature of Bovine Milk Catalase. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57 (17), s. 8018 – 8025.

SILANIKOVE, N., MĚŘÍN, U., SHAPIRO, F., LEITNER, G., 2014: *Subclinical mastitis in goats is associated with upregulation of nitric oxide-derived oxidative stresses that causes reduction of milk antioxidative properties and impairment of its quality*. *Journal of Dairy Science*, 97 (6), s. 3449 – 3455.

SOUZA, F., N., BLAGITZ, M., G., PENNA, C., F., A., M., DELLA LIBERA, A., M., M., P., HEINEMANN, M., B., CERQUEIRA, M., M., O., P., 2012: Somatic cell count in small ruminants: Friend of foe? *Small Ruminant Research*, 107 (2 – 3), s. 65 – 75.

STUHR, T., AULRICH, K., BARTH, K., KNAPPSTEIN, K., LARSEN, T., 2013: Influence of udder infection status on milk enzyme activities and somatic cell count throughout early lactation in goats. *Small Ruminant Research*. 111 (1 – 3), s. 139 – 146.

ŠLOSÁRKOVÁ, S., 2012: Neinfekční onemocnění ovcí, s. 291 – 297, In HORÁK, F., AXMANN, R., (eds). 2012: *Chováme ovce*. Brázda, Praha, 384 s., ISBN: 978-80-209-0390-7.

THEODORU, G., KOMINIKIS, A., ROGDAKIS, E., POLITIS, I., 2007: Factors affecting the plasmin-plasminogen system in milk obtained from free Greek dairy sheep breeds with major differences in milk production capacity. *Journal of Dairy Science*, 90 (7), s. 3263 – 3269.

TOGEL', P., 2014: *Meracie a automatizačné prvky v chove dojníc*. *Slovenský chov*, 19 (3), s. 27 -29.

URECH, E., PUHAN, Z., SCHÄLLIBAUM, M., 1999: Changes in milk protein fraction as affected by subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 82 (11), s. 2402 – 2411.

VASIL' M., 2001: Mastitidy. s. 673 – 707. In KOVÁČ, G., BAJOVÁ, V., (eds), 2001: *Choroby hovädzieho dobytku*, M & M vydavateľstvo, Prešov, s. 878. ISBN: 80-88950-14-7.

VĚŘÍŠ, M., 2013: *Využití testů k rychlé diagnostice mastitid v praxi*. *Náš chov*, 2, s. 51 – 53.

VIGUER, C., ARORA, S., GILMARTIN, N., WELBECK, K., O'KENNEDY, R., 2009: Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends in Biotechnology*, 27 (8), s. 486 – 493.

VRŠKOVÁ, M., M IDRIS, S., E., TANČIN, V., KIRCHNEROVÁ, K., 2014: *Dynamika vývoja mastitidnej mikroflóry a jej rezistencie voči antibiotikám*. *Slovenský chov*, 19 (5), s. 34 – 36.

WELBECK, K., LEONARD, P., GILMARTIN, N., BYRNE, B., VIGUIER, C., ARORA, S., O'KENNEDY, R., 2011: Generation on an anti-Nagasse single chain antibody and its application in biosensor-based assay for the detection of Nagasse in milk. *Journal of Immunological Method*, 364 (1 – 2), s. 14 – 20.

YANG, M., YUE, X., XU, X., WANG, Y., WU, J., WU, R., 2014: Comparison of Milk Enzymes in Different Lactation Periods. *IERI Prodedia*, 8, s. 46 -51.

ZAVADILOVÁ, L., ŠTÍPKOVÁ, M., SVITÁKOVÁ, A. 2014: *Mastitida u dojníc – genetické vzťahy k ďalším znakom*. *Náš chov*, 2, s. 54 -55.

ZEHNÁLEK, 2014: *Přednášky z bioanalytických metod*, Brno, Mendelova univerzita,

9 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Interpretace výsledků aktivity LDH (NÁVODY).....	37
Tabulka 2: Naměřené hodnoty mléka, ze kterého byly somatické buňky odstředěny z 5. listopadu 2013	40
Tabulka 3: Naměřené hodnoty mléka, ze kterého somatické buňky nebyly odstředěny z 5. listopadu 2013	41
Tabulka 4: Naměřené hodnoty mléka, ze kterého somatické buňky nebyly odstředěny z 18. listopadu 2013	41
Tabulka 5: Naměřené hodnoty mléka, ze kterého byly somatické buňky odstředěny z 18. listopadu 2013.....	42
Tabulka 6: Naměřené hodnoty mléka, ze kterého somatické buňky nebyly odstředěny z 26. listopadu 2013	42
Tabulka 7: Naměřené hodnoty mléka, ze kterého byly somatické buňky odstředěny z 26. listopadu 2013	43
Tabulka 8: Naměřené hodnoty mléka, ze kterého somatické buňky nebyly odstředěny z 8. října 2014.....	43
Tabulka 9: Naměřené hodnoty mléka, ze kterého byly somatické buňky odstředěny z 8. října 2014	44
Tabulka 10: Naměřené hodnoty mléka, ze kterého somatické buňky nebyly odstředěny z 14. ledna 2015	44
Tabulka 11: Naměřené hodnoty mléka, ze kterého byly somatické buňky odstředěny z 14. ledna 2015	45
Tabulka 12: Naměřené hodnoty mléka, ze kterého somatické buňky nebyly odstředěny z 20. ledna 2015	45
Tabulka 13: Naměřené hodnoty mléka, ze kterého byly somatické buňky odstředěny z 20. ledna 2015	46
Tabulka 14: Naměřené hodnoty mléka, ze kterého somatické buňky nebyly odstředěny z 23. ledna 2015	46
Tabulka 15: Naměřené hodnoty mléka, ze kterého byly somatické buňky odstředěny z 23. ledna 2015	47

10 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Schematické znázornění vývoje mastitidy infikovaného vemene (VIGUIER a kol., 2009).....	12
Obrázek 2: Vodivostní cela vyrobená v laboratoři (FERRERO a kol., 2014).....	23
Obrázek 3: Testovací proužky, reagentie a návody k <i>The Porta SCC milk test</i> (http://www.portacheck.com/portascc.php).....	36
Obrázek 4: Testovací proužky, reagentie, pipety a barevná škála pro vizuální odhad počtu somatických buněk u <i>The Porta SCC quick test</i> (http://www.portacheck.com/portascc.php).....	36
Obrázek 5: Testovací proužky pro <i>The Potra SCC milk test</i> po nanesení vzorku mléka a reagentie a po uplynutí 45 minut (nahore), testovací proužky s reagenčním polštářkem poté, co byly ponořeny do mléka a uplynutí 2 minut (dole).....	38
Obrázek 6: Graf znázorňující aktivitu LDH a počet somatických buněk v neodstředěném mléce (hodnoty počtu somatických buněk pocházejí z měření z akreditované laboratoře).....	48
Obrázek 7: Graf znázorňující aktivitu LDH a počet somatických buněk v odstředěném mléce (hodnoty počtu somatických buněk pocházejí z měření z akreditované laboratoře).....	49