

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie výživy a dietetiky



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Studium interakcí antibiotik a antiseptických látek
přírodního charakteru**

Diplomová práce

Autor práce Bc. Angelika Pelcová

Kvalita potravin a zpracování zemědělských produktů

Vedoucí práce prof. MVDr. Eva Skřivanová, Ph.D.

© 2022 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Studium interakcí antibiotik a antiseptických látek přírodního charakteru" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne datum odevzdání

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala prof. MVDr. Evě Skřivanové, Ph.D. za odborné vedení mé práce, poskytnutí cenných rad, připomínek, trpělivosti, a zvláště za čas, který mi věnovala. Rovněž děkuji za odborné konzultace a spolupráci na laboratorních pracích Ing. Lucii Malé. Děkuji také mému manželovi za trpělivost a příjemné pracovní zázemí. Dále děkuji mé sestře za technickou podporu.

Studium interakcí antibiotik a antiseptických látek

Souhrn

Bovinní mastitida je infekční onemocnění, jež má negativní dopad na mlékárenský průmysl. Tuto nemoc rovněž zapříčiňují bakteriální kmeny, jež mohou vykazovat rezistenci na antibiotickou terapii. To může mít velmi nežádoucí vliv na samotnou léčbu, welfare dojníc a ekonomické aspekty. I mezi streptokokálními původci mastitidy se mohou vyskytovat kmeny s určitou mírou odolnosti vůči antibiotikům. Z tohoto důvodu byly v této závěrečné práci vybrány dva streptokokální původci mastitidy – *Streptococcus agalactiae* (CCM 6187) a *Streptococcus dysgalactiae* (DSM 20662).

Tato práce byla zaměřena na téma působení antiseptických látek přírodního charakteru, konkrétně pyrithion zinku (ZnP) v reakci s patogenními kmeny *Streptococcus* spp. Dalším cílem bylo zjistit antimikrobiální aktivitu ZnP a gentamicinu (GEN) a následně určit typy interakcí ZnP s GEN za použití *in vitro* mikrodiluční-šachovnicové metody. K tomu byly použity destičky o devadesáti šesti jamkách určené k mikrotitraci. Mikrodiluční metoda v těchto destičkách byla nejprve využita pro zjištění antimikrobiální aktivity ZnP a GEN. Poté byl stejný typ destiček použit u mikrodiluční-šachovnicové metody. Na základě z této metody obdržených indexů frakčních inhibičních koncentrací byly vyhodnoceny vzniklé interakce kombinace těchto antiseptik.

V této práci byla stanovena antimikrobiální činnost ZnP a GEN ve vztahu k patogenním kmenům *Str. agalactiae* a *Str. dysgalactie*. Dále byly nalezeny synergické a aditivní interakce ZnP v kombinaci s GEN. Synergismus ZnP s GEN byl detekován jak u *Str. agalactiae* při koncentracích ZnP 0,0625 $\mu\text{g/ml}$ až 0,0078125 $\mu\text{g/ml}$, tak a u *Str. dysgalactiae* při koncentracích ZnP od 0,25 $\mu\text{g/ml}$ až 0,0625 $\mu\text{g/ml}$. U zbylých koncentrací ZnP se jednalo o aditivní účinky. Na základě přítomnosti synergických interakcí testovaných látek v této práci, je vhodné pokračovat v dalším studiu této problematiky.

Klíčová slova: inhibice; synergie; streptococcus; infekce; rezistence

Interactions of naturally-derived antiseptics and antibiotics

Summary

Bovine mastitis is an infectious disease, which has a negative impact on the dairy industry. This illness is also caused by bacterial strains, which may be resistant to the antibiotic therapy. This can have an undesirable impact on the treatment itself, welfare of the dairy cows and the economical aspects. Even streptococcal pathogens causing bovine mastitis include strains which may be resilient to antibiotics. That is the reason, as to why in this final thesis, two strains of pathogenic *Streptococcus* spp. were chosen – *Streptococcus agalactiae* (CCM 6187) and *Streptococcus dysgalactiae* (DSM 20662).

This thesis was focused on the topic of the influence of naturally-derived antiseptics, in particular zinc pyrithione (ZnP) in reaction with the pathogenic strains of *Streptococcus* spp. The next objective included the determination of the antimicrobial activity of ZnP and of gentamicin (GEN) and subsequently to identify the types of interactions of the combination of ZnP with GEN using the *in vitro* microdilution-checkerboard method. For this method, plates containing ninety six wells intended for microtitration, were used. Firstly, microdilution method in these plates was used to assess the antimicrobial activity of ZnP and GEN. Then, the same type of plates was used in microdilution-checkerboard method. Based on the fractional inhibitory concentrations indices acquired from this method, interactions of the combined antiseptics were evaluated.

In this work, antimicrobial activity of ZnP and GEN in relation to the pathogenic strains of *Str. agalactiae* and *Str. dysgalactie* was determined. Afterwards, synergistic and additive interactions of ZnP combined with GEN were found. Synergisms of ZnP with GEN were detected in *Str. agalactiae* (with the concentration of zinc pyrithione 0,0625– 0,0078125 µg/ml) and in *Str. dysgalactiae* (with the concentration of zinc pyrithione 0,25– 0,0625 µg/ml). The rest of the interactions were additive effects. Based on the presence of the synergistic interactions of the tested substances in this thesis, it is beneficial to continue the study of this matter.

Keywords: inhibition; synergy; streptococcus; infection; resistance

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Vědecká hypotéza a cíle práce.....	9
2.1	Hypotéza	9
2.2	Cíl práce.....	9
3	Literární rešerše	10
3.1	<i>Streptococcus</i> spp.....	10
3.1.1	Charakteristika	10
3.1.2	Zástupci rodu <i>Streptococcus</i> spp.	10
3.1.2.1	<i>Streptococcus agalactiae</i>	11
3.1.2.2	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	12
3.2	Léčba a prevence výskytu mastitid.....	13
3.2.1	Antibiotika	14
3.2.1.1	Bakteriální rezistence vůči antibiotikům	16
3.2.1.2	Gentamicin.....	20
3.2.2	Další přístupy vedoucí k potlačení bakteriálních infekcí	22
3.2.2.1	Očkování.....	22
3.2.2.2	Rostlinné extrakty	22
3.2.2.3	Enzymy	25
3.2.2.4	Imunoterapie	26
3.2.2.5	Organické kyseliny	26
3.2.2.6	Antimikrobiální peptidy.....	27
3.2.2.7	Bakterifoágy	28
3.2.2.8	Probiotika.....	29
3.2.2.9	Nanočástice.....	30
3.2.3	Pyrithion zinek.....	31
3.3	Typy interakcí antimikrobiálních látek	34
4	Metodika.....	36
4.1	Materiál.....	36
4.1.1	Testované látky	36
4.1.2	Bakteriální kmeny a podmínky kultivace	36
4.2	Testování minimálních inhibičních koncentrací gentamicinu a pyrithion zinku	37
4.3	Posouzení typů interakcí gentamicinu v kombinaci s pyrithion zinkem ..	37
4.4	Stanovení frakčních inhibičních koncentrací gentamicinu a pyrithion zinku	38

5	Výsledky.....	40
6	Diskuze.....	- 42 -
7	Závěr	- 45 -
8	Literatura.....	i

1 Úvod

V medicíně, humánní i veterinární, jsou k léčbě ran a povrchových zánětů bakteriálního původu hojně využívána antibiotika. Jejich masivní spotřeba však značně přispívá k šíření bakteriální rezistence k antibiotikům, což je celosvětový problém, který je třeba řešit. Není tedy překvapením, že jedním z cílů Světové zdravotnické organizace je posílit všechny státy, konkrétně rozvojové země, pro včasnou výstrahu, snížení rizik a organizaci při národních a globálních zdravotních hrozbách (WHO 2021). V praxi je sledována vyšší míra rezistence na antibiotickou léčbu. Rezistentní kmeny mohou být například zástupci *Pseudomonas aeruginosa* k betalaktamovým antibiotikům, karbapenemům a k cefalosposinům; enterobakterie k betalaktomovým antibiotikům; *Staphylococcus aureus* vůči vankomycinu, metilcinu, či oxacilinu; a mnoho dalších (Krejčí 2020). Uvádí se, že celková ekonomická ztráta způsobená průměrným případem bovinní mastitidy může stát chovatele dojnic až 444 amerických dolarů za každý případ infekce (v přepočtu 9926 Kč) (Rollin et al. 2015).

Použitím nových antibiotik, látek přírodního charakteru s antibakteriálními účinky, popřípadě jejich kombinací, lze této skutečnosti předcházet. Látky přírodního charakteru s antibakteriálními účinky mají v některých případech odlišný mechanismus inhibice než běžně používaná antibiotika, což je indikátorem pro studium možné synergie daných látek (Caterina et al. 2013). Mezi látky přírodního charakteru s potenciálem vhodně působit na mikroorganismy působící záněty povrchových tkání patří například pyrithion zinek, který v této oblasti vykazuje velký antimikrobiální potenciál (Guthery et al. 2005).

Pyrithion zinek (ZnP), derivát kyseliny aspergilové, je vyhledáván pro svůj antimikrobiální účinek. Ten je využíván pro svou významnou aktivitu při potlačení výskytu lupů a dalších infekcí kvasinkového původu (Mangion et al. 2021). Nejenom z tohoto důvodu byla antimikrobiální aktivita ZnP vůči vybraným patogenním bakteriím v této diplomové práci studována (Guthery et al. 2005; Blanchardem et al. 2016).

V rámci této závěrečné práce byly zjištěny minimální inhibiční koncentrace u patogenních kmenů *Streptococcus agalactiae* a *Streptococcus dysgalactiae* ke stanovení antimikrobiální aktivity ZnP a gentamicinu – antibiotika, jež je často užíváno při léčbě bovinní mastitidy. Dále byly zjištěny typy interakcí kombinace těchto antiseptik v reakci s výše zmíněnými bakteriálními druhy pomocí mikrodiluční-šachovnicové metody.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

2.1 Hypotéza

Pyrithion zinek bude v kombinaci s vybranými antibiotiky vykazovat některý z typů interakcí (synergismus/antagonismus/aditivní účinek) v reakci s patogenními kmeny *Streptococcus* spp.

2.2 Cíl práce

Vytvořit literární rešerši na téma působení antiseptických látek přírodního charakteru, konkrétně pyrithion zinku vůči patogenním kmenům *Streptococcus* spp. Stanovit minimální inhibiční aktivitu jednotlivých látek a následně i typy interakcí pyrithion zinku s vybranými antibiotiky pomocí mikrodiluční-šachovnicové metody.

3 Literární rešerše

3.1 *Streptococcus* spp.

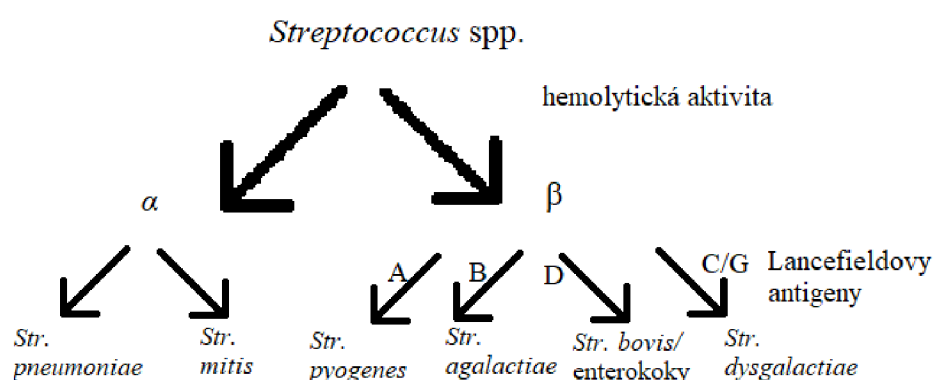
3.1.1 Charakteristika

Rod *Streptococcus* tvoří zástupci Grampozitivních, sférických či ovoidních nepohyblivých bakterií (0,5-2 μm), které se většinou sdružují v párech nebo řetzcích. Nesporulují, jsou fakultativně anaerobní, kataláza negativní a hydrolyzující eskulín (Hardie & Whiley 1997; Hillerton & Berry 2003; Kabelitz et al. 2021; Lannes-Costa et al. 2021).

Tento rod se vyskytuje v půdě, vodě, mléčných produktech, potravinách, rostlinách, u zvířat (*Str. canis*, *Str. equi*, *Str. suis*, *Str. porcinus*, *Str. uberis*, *Str. bovis*) a i u člověka (*Str. oralis*, *Str. parasanguinis*, *Str. salivarius*, *Str. thermophilus*) (Hardie & Whiley 1997; Kabelitz et al. 2021).

3.1.2 Zástupci rodu *Streptococcus* spp.

Klasifikace streptokoků je složitá a je založena na několika znacích zahrnující hemolytické vzorce na krevním agaru, biochemické reakce, antigenní skladbu a genetickou analýzu. Jejich hemolýza se dělí na: částečnou (α -hemolýza), kompletní (β -hemolýza) a nehemolytickou. α -hemolytické rody při redukcí hemoglobinu produkují zelené zbarvení na krevním agaru. β -hemolytické streptokoky jsou členěny do sérových skupin, které jsou stanoveny dle antigenních rozdílů sacharidů buněčné stěny. Streptokoky, se mohou dále klasifikovat pomocí antigenních skupin (Lancefieldovy antigeny), biochemických reakcí či molekulárních metod (Torok & Day 2009; Peters et al. 2017). Obrázek níže zobrazuje klasifikaci streptokoků (Obrázek 1, Peters et al. 2017).



Obrázek 1: Klasifikace streptokoků (Peters et al. 2017)

Str. pyogenes (skupina A) je nezanedbatelný lidský patogen, který způsobuje akutní zánět hltanu, spálu, kožní a systematické infekce. Dalšími infekcemi mohou být zánět mandlí, bakteriémie, tvorba hlubokých abscesů či nekrotická fasciitida. Jedná se o β -hemolytické koky, jež rostou v párech nebo krátkých řetzcích (Torok & Day 2009; Peters et al. 2017).

Skupiny C a G (*Str. equi*, *Str. dysgalactiae*), tohoto bakteriálního rodu jsou β -hemolytické streptokoky, které kolonizují nosohltan, kůži a genitální ústrojí. Infekce jimi způsobené se podobají infekcím vyvolaným bakteriemi skupiny A. Zahrnují zánět hltanu, zánět plic, endokarditidu, bakteriémii, neonatální sepsi a meningitidu (Tanaka et al. 2008; Torok & Day 2009; Peters et al. 2017; Haenni et al. 2018).

Kolonizace nosohltanu *Str. pneumoniae*, α -hemolytickým kokem, je častá jak u dětí, tak u dospělých a úmrtnost při invazivní infekci se pohybuje kolem 10 %. Dále může tento druh zapříčinit septickou artritidu, endokarditidu a meningitidu (Peters et al. 2017).

Skupina streptokok viridans (*Str. faecium*, *Str. mutans*, *Str. salivarius*, *Str. anginosus*, *Str. sanguinis*) jsou převážně komenzálové v gastrointestinálním, dýchacím a ženském pohlavním traktu. Nejvíce se vyskytují v dutině ústní. Mají nízkou patogenitu až na jejich sklon adherovat k srdečním chlopním a způsobovat endokarditidu. Jedná se o fakultativně anaerobní, kataláza negativní Grampozitivní bakterie, které jsou hlavně α -hemolytické (Torok & Day 2009; Doern & Burnham 2010; Peters et al. 2017)

Někteří zástupci streptokoků bývají spjaty s mastitidou (*Str. uberis* a *Str. agalactiae*, *Str. parauberis*, *Str. salivarius*, *Str. sanguinis*, *Str. canis*, *Str. lutetiensis* a *Str. equinus*) (Wyder et al. 2011; Kabelitz et al. 2021). Mastitida neboli zánět mléčné žlázy, může zahrnovat symptomy jako otoky, teplotu, bolest vemene, nestandardní mléčnou produkci, zvýšenou tělesnou teplotu, letargii a anorexii (Kabelitz et al. 2021).

Výskyt mastitid v chovech skotu je nežádoucí z několika hledisek. Z pohledu ekonomiky chovu je třeba počítat s vyřazením mléka od postižených dojníc z dodávky, dále zde hrají roli náklady na veterinární ošetření, léčiva a větší nasazení zaměstnanců. Je však třeba zmínit i negativní vliv na welfare postižených zvířat. Uvádí se, že ekonomické ztráty kvůli mastitidě mohou vyjít až na 444 amerických dolarů na krávu za rok (v přepočtu 9926 Kč) (Rollin et al. 2015; Kabelitz et al. 2021). Během prvních dvou týdnů od počátku infekce může bovinní mastitida znamenat ztrátu pro chovatele až 1,0–2,5 kg mléka/den. Celková ztráta mléka kvůli této nemoci může dosahovat až 110–552 kg závisle na stáří dojnice, laktačním stádiu, dosavadním počtu otelení (čím vyšší je počet otelení, tím je vyšší pravděpodobnost nákazy mastitidou) a hygienou daného chovu (Rajala-Schultz et al. 1999; Hogan & Smith 2003; Sharun et al. 2021). Mastitida způsobená streptokoky trvá v případě akutní infekce cca 12 dní, nicméně přechodem do chronického stádia se její trvání může značně prodloužit (až na 300+ dní) (Kabelitz et al. 2021). Podle studie Hogan & Smith (2003) cca 41 % incidencí mastitid má trvání do 8 dní a pouze 15 % trvá přes 90 dní. Pokud akutní onemocnění není dobře zaléčeno, může se stát chronickým a vést až ke snížené plodnosti. Z toho důvodu je zapotřebí rychlé, ekonomické, jednoduché a zároveň účinné metody pro identifikaci původce a posléze možnou léčbu mastitidy. K tomu patří dvě fáze: průkaz výskytu mastitidy a identifikace infekčního agens. Od roku 1992 je evropský standard pro počet somatických buněk (PSB) v mléce do 400 000 na 1 ml. U nádoje od dojníc s mastitidou je běžný nález PSB >1 000 000 buněk/ml (Hillerton & Berry 2003; Kabelitz et al. 2021).

3.1.2.1 *Streptococcus agalactiae*

Str. agalactiae (skupina B) je běžným komenzálem mukózní vrstvy u lidí, ale i důležitý patogen u těhotných, novorozenců a žen po porodu. Četnost asymptomatické kolonizace vagíny u těhotných žen je poměrně vysoká (5–40 %) a hrozí vertikální přenos na plod během porodu. Nejhorší nebezpečí infekce hrozí novorozencům (neonatální sepsi, bakteriémie a meningitida), ale i u dospělých se může vyskytovat bakteriémie. U těhotných často hrozí zánět močového měchýře či infekce močových cest (Torok & Day 2009; Pereira et al. 2010; Kabelitz et al. 2021; Lannes-Costa et al. 2021).

Streptococcus agalactiae je CAMP pozitivní a eskulín negativní. *Str. agalactiae* je považovaný za β -hemolytický, ale vyskytuje se i několik nehemolytických kmenů. Tento druh má 9 odlišných kapsulárních sérotypů: Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII a VIII a desátý sérotyp IX byl objeven v roce 2007. Infekčnost tohoto druhu se liší na základě jednotlivých sérotypů (Kabelitz et al. 2021). Donedávna kapsulární typy Ia, Ib, III a V stály za 98 % lidské kolonizace a infekce (Lannes-Costa et al. 2021).

Str. agalactiae ke své virulenci přispívá kódováním enzymu lyázy, který štěpí hyaluronát. Odbouráváním hyaluronátu usnadňuje invazi pojivových tkání podobně, jak to dělá streptokináza u *Str. dysgalactiae*. Zároveň podporuje hydrolyzu kaseinu, kdy takto uvolněné aminokyseliny mohou sloužit jako živiny potřebné pro další mikroorganismy. U tohoto druhu byla zjištěna schopnost tvořit póry pomocí toxinů. Též je pozoruhodná jeho rezistence k antimikrobiálním peptidům. Existuje řada dalších faktorů zapříčiňující virulenci *Str. agalactiae* jako je například tvorba biofilmů a repetitivní proteiny bohaté na serin, které mu umožňují přilnout k lidskému keratinu a epitelialním buňkám (Kabelitz et al. 2021).

Streptococcus agalactiae je spojován s meningoencefalitidou u ryb a mastitidou krav (Pereira et al. 2010; Kabelitz et al. 2021). Vyskytuje se v bovinním gastrointestinálním traktu, a i v prostředí stáje. *Str. agalactiae* může na neurčito přetrvávat v mléčných žlázách dojníc, kde jeho přežívání značně usnadňuje schopnost těchto bakterií tvořit biofilm (Cheng & Han 2020). Ten jim pomáhá adherovat a přetrvávat v prostředí hostitele. K přenosu *Str. agalactiae* na další zvířata může docházet během procesu dojení (Wyder et al. 2011). V minulosti vysoce infekční bakterie je v dnešní době dobře zvladatelná pomocí antimikrobiálních ošetření a udržování dobré hygieny provozu (Hillerton & Berry 2003; Cheng & Han 2020; Kabelitz et al. 2021; Lannes-Costa et al. 2021).

15–30 % kmenů *Str. agalactiae* je rezistentní na erythromycin a klindamycin, což jsou jedny z nejčastěji používaných antibiotik k léčbě infekce způsobených touto bakterií. Je možné využívat antibiotika gentamicinu (GEN) s příznivými výsledky (Larsen & Sever 2008). Bohužel neexistuje žádná účinná vakcína proti *Str. agalactiae* (Armistead et al. 2019; Pinto et al. 2021).

3.1.2.2 *Streptococcus dysgalactiae*

Str. dysgalactiae je α -hemolytický, CAMP negativní a eskulín negativní (C a G skupina streptokoků dle Lancefielde). Většina kmenů *Str. dysgalactiae* jsou nehemolytické s α -hemolytickými výjimkami. *Str. dysgalactiae* patří mezi patogeny způsobující mastitidu. Je schopen přežít jak v hostiteli, tak i v prostředí stáje. Tento druh je spojován s infekcemi skotu, ale vyskytuje se i u jiných přežvýkavců jako jsou kozy či ovce. U lidí tato bakterie zapříčiňuje endokarditidu, kloubní infekce a celulitidu (Haenni et al. 2018; Kabelitz et al. 2021).

Bylo zjištěno, že moucha druhu *Hydrotea irritans* hraje důležitou roli v přenosu *Str. dysgalactiae* *dysgalactiae*. Tyto mouchy se ve stájovém prostředí vyskytují hlavně v létě, což může být důvodem častějších incidencí mastitidy v létě oproti zimním či jarním měsícům (Kabelitz et al. 2021).

Str. dysgalactiae je schopen na sebe poutat extracelulární bílkovinný matrix jako je fibronectin, který je hlavní složkou pojivých tkání. Tím podporuje bakteriální přilnavost k tkáním mléčné žlázy. Vazba na extracelulární bílkovinný matrix je klíčovým u tvorby biofilmu, který může přetrvávat i na hydrofilním povrchu. Ten je důležitým faktorem patogenity u *Streptococcus dysgalactiae* (též i u *Str. uberis*). Jako účinná látka proti tomuto biofilmu může být využit flavonol fisetin (Kabelitz et al. 2021).

Str. dysgalactiae vylučuje streptokinázu, která může narušovat fibrin a pojivové tkáně a tím pomoci této bakterii se infiltrovat hlouběji do tkání hostitele. Při kontaktu plazminogenu se streptokinázou je plazminogen přeměněn na plazmin. Plazmin bakterii umožňuje hydrolýzu bílkovin v pojivových tkání a následně její vniknutí do tkání hostitele. Kromě těchto enzymů *Str. dysgalactiae* produkuje hyaluronidázu, která odbourává kyselinu hyaluronovou. Kyselina hyaluronová je důležitým polysacharidem pojivových tkání a její destrukci je *Str. dysgalactiae* schopen invaze hostitelských tkání (Kabelitz et al. 2021).

3.2 Léčba a prevence výskytu mastitid

Mastitida je komplexní, multifaktoriální onemocnění. Kvůli tomu její léčba není snadná. Při antimikrobiální terapii streptokokální mastitidy je léčba cílena na ošetření mléčných struků, kanálků a alveolů mléčné žlázy (Kabelitz et al. 2021).

K zamezení šíření bakteriálních druhů způsobujících mastitidu se doporučuje řada preventivních opatření (Wyder et al. 2011). Infekční patogeny mastitidy jako *S. aureus*, *Str. agalactiae*, *Mycoplasma bovis* a *Corynebacterium* spp. přebývají ve vmenu krávy a kůži struku. Tyto mikroorganismy jsou schopné způsobit subklinické infekce většinou spjaté se zvýšenou hladinou PSB. Tento typ infekce lze potlačit snížením kontaktu mezi zdravými a nemocnými jedinci. Oproti infekčním patogenům, environmentální patogeny mastitidy (*E. coli*, *Str. uberis*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp.) pochází z podestýlky a zázemí stáda. Jsou popisovány jako příležitostné patogeny, které vyhledávají možnost infekce. Tou příležitostí může být snížená imunita jedince či mechanické narušení struku (Cheng & Han 2020). Infekce mastitidy se šíří kontaktem s nemocným jedincem, podestýlkou, zeminou, hnojem, výkaly, stojatou vodou, během dojení od dojícího zařízení, personálu či vybavení stáje. Environmentální mastitida je velmi ovlivněna zoohygienou a organizací daného provozu (Sharun et al. 2021). Možnost prevence nákazy zahrnuje i výběr podestýlky. Slaměná podestýlka je většinou spojována s výskytem *Str. uberis*. Tato podestýlka je často používána při otelení, a proto může znamenat pro krávu značný risk. Na druhou stranu u podestýlky z pilin, či u steliva z anorganických materiálů jako je písek či rozdrčený vápenec byly zaznamenány nejmenší počty bakterií. Hygiena však není jediným aspektem pro výběr steliva. Je třeba brát v potaz i welfare dojnice. Je známo, že místa na polehávání a odpočívání krav často dávají možnost znečištění struku, který je na vemeni jedinou přístupovou cestou k mléčné žláze. Obecně krávy chované na pastvě mají nižší incidenci mastitidy než ty ustájené. U dojnic, které se pohybují zejména venku, je však dbát na to, aby na pastviny nebyly příliš zamokřené či příliš spasené. Tyto podmínky by totiž mohly vést k infekci mastitidy (Hogan & Smith 2003; Hillerton & Berry 2003; Wyder et al. 2011). Po nadojení je doporučeno pro dojnici minimálně hodinu stát, aby se strukový kanálek patřičně uzavřel a nemohly do něj vniknout patogeny z prostředí (Hillerton & Berry 2003). Dalšími důležitými faktory je dostatečná ventilace, vzdušná vlhkost, hygiena, dobrá dojící technika, dezinfekce struku a jeho zasušení. Nakažení jedinci musí být rychle identifikováni a odděleni od stáda, aby se nákaza nešířila. Při aplikaci těchto měřítek byla incidence streptokokální mastitidy snížena o 50 % (Hogan & Smith 2003; Kabelitz et al. 2021).

Pro regulaci infekčních patogenů se doporučuje dodržovat takzvaný pětibodový plán. Tento plán zahrnuje: 1) identifikaci a léčbu klinických případů; 2) dezinfekci struku po dojení; 3) období stání na sucho; 4) redukci chronických případů; a 5) rutinní údržbu dojící techniky. U environmentálních patogenů je bohužel tento plán často nedostatečný, a proto je vhodné zařadit i další strategie ke kontrole mastitidy (Cheng & Han 2020).

3.2.1 Antibiotika

Hlavní strategií léčby mastitidy je antibiotická terapie (Kabelitz et al. 2021). Výběr antimikrobiálního prostředku závisí na jeho farmakokinetických vlastnostech jako například: jeho dostupnosti a distribuci k mléčné žláze, schopnosti se vázat na bílkovinné fragmenty postižené žlázy, či jeho afinita k lipidové a vodné fázi. Pro stanovení optimálního dávkování je třeba znalost farmakodynamiky daného přípravku. Ideálně by látka cílená na streptokoky z prostředí měla mít co nejnižší minimální inhibiční koncentraci (MIC) a měla by tedy působit při co nejnižších koncentracích (Hillerton & Berry 2003).

Je všeobecnou snahou omezit užívání antimikrobiálních látek u hospodářských zvířat, zejména z důvodu zamezení šíření rezistence bakterií k antibiotikům. Proto jsou antibiotika předepisována pouze pro danou indikaci a je snaha jimi neplýtvat. U mírných případů mastitidy jsou dobrou volbou alternativy antibiotik. Oproti tomu u středních až těžkých případů je vhodné antibiotika nasadit, zejména pro dosažení vyhovující kvality mléka a welfare zvířat. Rychlost a doba léčby se může lišit na základě síly onemocnění. Při léčbě mastitidy se chovatel soustředí nejenom na welfare zvířat, ale i na ekonomické a v neposlední řadě klinické aspekty daného postupu. Uzdravení znamená možnost dřívějšího prodeje mléka. Bakteriologické vyléčení znamená snížení pravděpodobnosti návratu infekce. Účinnost léčby závisí na závažnosti mastitidy, individuálních rozdílech mezi dojnici, léčebným režimem a rychlosti nastolení léčby. Pro dobře cílenou terapii je vždy doporučeno identifikovat patogen způsobující infekci. Na druhou stranu, pozdní léčba antibiotiky může znamenat neschopnost léčby mastitidy, a i vyrazení dojnice (Hillerton & Berry 2003; Cheng & Han 2020).

Nejčastěji jsou k léčbě mastitid uplatňovány aminoglykosidy (GEN), makrolidy (erythromycin, tilmokosin) a β -laktamová antibiotika (penicilin G, oxacilin, ampicilin). Většinou jsou podávány intramamárně či parenterálně intramuskulární injekcí. Intramamární aplikace má výhodu nižší spotřeby účinné látky a vyvaruje se systémového šíření antibiotik v daném jedinci (Denamiel et al. 2005; Kabelitz et al. 2021).

Patogeny jako *Str. uberis* a *Str. agalactiae*, které jsou schopny sídlit intracelulárně v mléčné žláze a tvořit abscesy (ohraničený hnisavý zánět), jsou náročnější na léčbu kvůli jejich schopnostem odolávat účinkům antibiotik. Proto mastitida jimi způsobená je předurčená k chronickému průběhu. Vyléčení pak značně závisí na včasném odhalení příznaků mastitidy a okamžitým zahájení léčby. Intramamární antibiotická terapie dosahuje účinnosti zhruba 90 % u subklinické mastitidy vyvolané *Str. agalactiae*, *Str. uberis* a *Str. dysgalactiae* a u jiných streptokoků 77 % (Kabelitz et al. 2021).

U *Str. agalactiae* a *Str. dysgalactiae* byla zjištěna citlivost na antibiotika tigeckylin, levofloxacin, vankomycin, ceftazidim a penicilin (Amyes 2007). První volbou k potlačení mastitid i nadále zůstávají β -laktamová antibiotika (penicilin) (Kabelitz et al. 2021).

Data ohledně patogenů mastitidy získaná od Microbiology Laboratory of the Animal Health Diagnostic Laboratory, Michigan State University z roku 1994 až 2000 zjistila, že streptokoky jsou potenciálně náchylné na β -laktamová antibiotika (penicilin, ampicilin) a cefalosporin (ceftiofur, cefapirin). *S. aureus* je na rozdíl od nich často rezistentní na léčiva, které mohou být inaktivovány β -laktamázou (ampicilin, peniciliny). U *S. aureus* může být dále rozvinuta rezistence na meticilin, aminoglykosidy, makrolidy, chloramfenikol, tetracyklin a fluorochinolony. Jednotlivá data citlivosti Gram pozitivních patogenů mastitidy na antibiotika jsou patrné v tabulce 1. Z tabulek 2 a 3 je patrná citlivost na jednotlivá antibiotika u *Str. agalactiae* a *Str. dysgalactiae* v čase. Z těchto dat vyplývá, že *Str.*

dysgalactiae je citlivý na ampicilin, cefalotin, ceftiofur, GEN, erythromycin, oxacilin, penicilin, sulfa-trimetoprim a pirlimycin. Tento bakteriální druh je méně citlivý na tetracyklin. Dále vyplývá to, že *Str. agalactiae* je citlivý na ampicilin, cefalotin, ceftiofur, erythromycin, oxacilin, penicilin a pirlimycin a méně citlivý na GEN, sulfa-trimethoprim a tetracyklin (Erskine et al. 2002; Erskine et al. 2003; Roberson 2012; Lopes et al. 2020).

Tabulka 1: Citlivost Grampozitivních patogenů mastitidy na vybraná antibiotika (Erskine et al. 2002)

Antibiotikum	<i>Str. agalactiae</i>	<i>Str. uberis</i>	<i>Str. dysgalactiae</i>	<i>S. aureus</i>
Ampicilin	97,4 %	97,9 %	99,2 %	50,4 %
Cefalotin	100,0 %	99,8 %	99,7 %	99,8 %
Ceftiofur	100,0 %	100,0 %	100,0 %	99,8 %
Erythromycin	84,6 %	68,1 %	82,0 %	93,1 %
Penicilin	96,1 %	94,5 %	94,5 %	50,4 %
Pirlimycin	92,9 %	79,9 %	89,0 %	97,9 %
Sulfa-trimethoprim	49,5 %	95,6 %	96,5 %	99,4 %
Tetracyklin	53,8 %	54,8 %	39,8 %	91,5 %

Tabulka 2: Citlivost *Str. agalactiae* na vybraná antibiotika v čase (Erskine et al. 2003)

Antimikrobiální látka	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	Suma
Ampicilin	100,0 %	100,0 %	88,9 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	97,4 %
Cefalotin	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %
Ceftiofur	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %
Erythromycin	100,0 %	73,3 %	77,8 %	55,6 %	75,0 %	81,8 %	100,0 %	84,6 %
Gentamicin	23,1 %	33,3 %	56,80 %	0,0 %	50,0 %	9,1 %	16,7 %	23,1 %
Oxacilin	92,3 %	93,3 %	94,4 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	96,2 %
Penicilin	98,2 %	92,9 %	94,1 %	95,0 %	86,2 %	90,9 %	92,1 %	96,1 %
Pirlimycin	100,0 %	76,9 %	100,0 %	ND	ND	100,0 %	100,0 %	92,9 %
Sulfa-trimethoprim	15,4 %	21,4 %	5,6 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	49,5 %
Tetracyklin	53,8 %	53,5 %	50,0 %	100,0 %	50,0 %	54,5 %	58,3 %	53,8 %

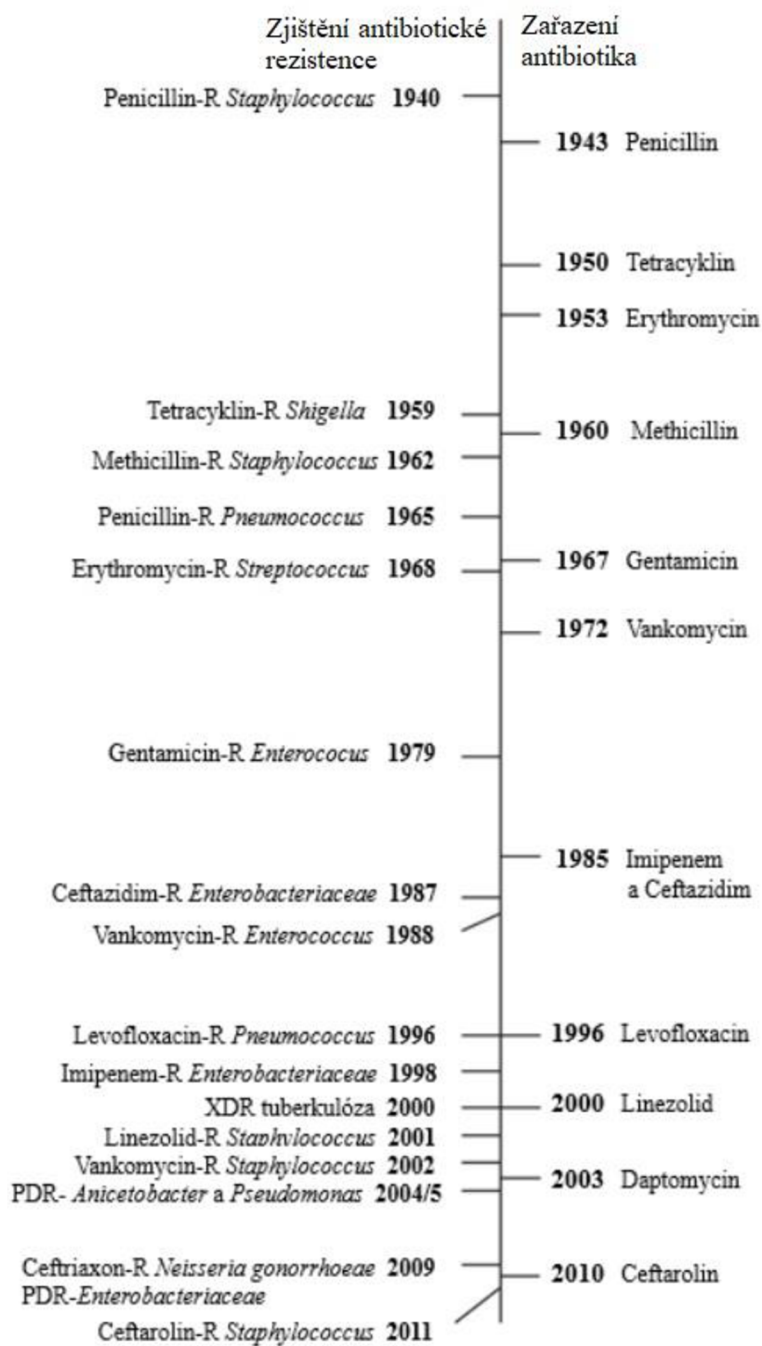
Vysvětlivky: ND = neexistující data

Tabulka 3: Citlivost *Str. dysgalactiae* na vybraná antibiotika v čase (Erskine et al. 2003)

Antimikrobiální látka	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	Suma
Ampicilin	96,7 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	98,4 %	100,0 %	100,0 %	99,2 %
Cefalotin	98,3 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	99,7 %
Ceftiofur	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %
Erythromycin	73,2 %	66,2 %	92,1 %	87,1 %	90,3 %	85,0 %	87,5 %	82,0 %
Gentamicin	91,1 %	96,9 %	90,5 %	100,0 %	100,0 %	98,3 %	100,0 %	96,8 %
Oxacilin	91,5 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	98,4 %	100,0 %	100,0 %	98,1 %
Penicilin	98,3 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	93,7 %	100,0 %	100,0 %	94,5 %
Pirlimycin	100,0 %	84,3 %	91,4 %	82,8 %	100,0 %	94,9 %	81,8 %	89,0 %
Sulfa-trimethoprim	83,3 %	97,0 %	100,0 %	98,1 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	96,5 %
Tetracyklin	23,3 %	16,9 %	7,1 %	24,1 %	73,0 %	67,2 %	67,6 %	39,8 %

3.2.1.1 Bakteriální rezistence vůči antibiotikům

Masivní používání antibiotik v oblasti veterinární péče, spolu se schopností některých původců mastitid tvořit biofilmy, vede k logickému podnětu k šíření rezistence těchto mikroorganismů k antibiotikům (WHO 2015; Sharun et al. 2021). Antibiotická rezistence u streptokoků způsobující mastitidu je rozšířená a má rostoucí tendenci. Míra rezistence závisí na kmeni bakterie, typu antibiotika, lokalitě, cílovém organismu a podmínkách daného chovu (Kabelitz et al. 2021).

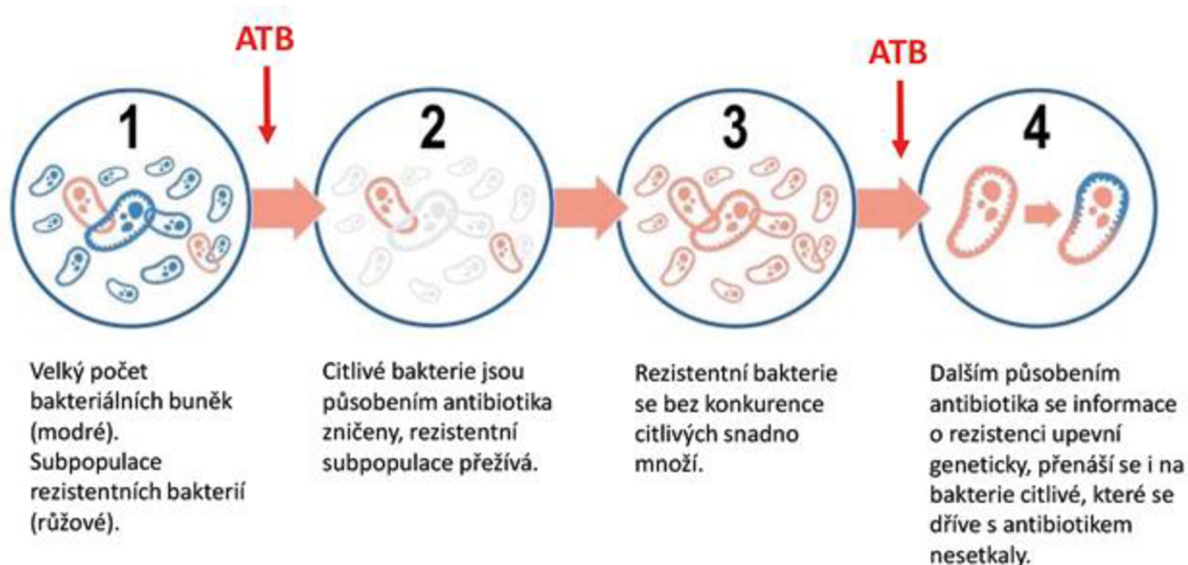


R=rezistentní; XDR =značně rezistentní; PDR=rezistence ke všem antibiotikům

Obrázek 2: Odolnost bakterií vůči antibiotikům v čase (Ventola 2015)

Objev nových antibiotik jde ruku v ruce s rozšiřováním antibiotické rezistence. Z historie vyplývá to, že krátce po objevu nových antibiotik vyvstaly nové rezistentní bakteriální kmeny, jež byly k těmto látkám odolné. Tato skutečnost poukazuje na nutnost vysoké opatrnosti používání těchto konvenčních léčiv (Ventola 2015). Epidemiologické studie poukázaly na přímý vztah mezi spotřebou antibiotik a tvorbou rezistentních bakteriálních kmenů (Nature 2013). Bakteriální odolnost vůči těmto antiseptickým látkám v průběhu dějin je patrná z obrázku 2 (Ventola 2015).

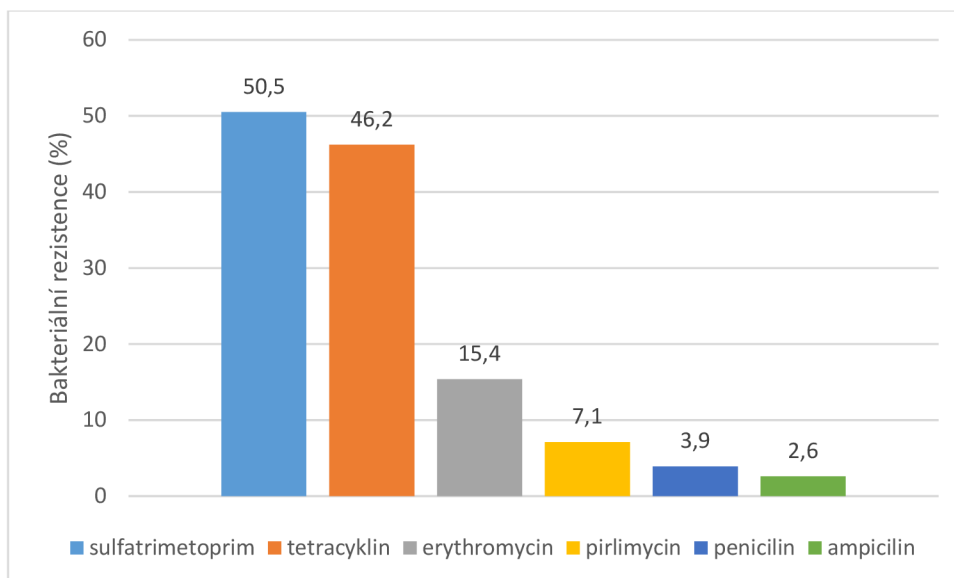
Rezistence bakterií k antibiotikům se může dělit dvěma způsoby: na fenotypovou a genotypovou (Krejčí 2020). U fenotypové rezistence dochází k pomocným mechanismům, jimiž se bakterie zbavuje antibiotik (uzavíráním porinů, přečkáváním ve stacionární fázi růstu, aktivním effluxem...) a přechodně dokáže odolávat těmto látkám (Corona & Martinez 2013). U genotypové rezistence dochází ke „změně genetické informace bakterií.“ Ta může být například získána ve formě plasmidu. Získané informace mohou předat bakteriální buňce podklady pro degradaci účinku antibiotika například prostřednictvím tvorby enzymu (např.: betalaktamáza u *S. aureus*) (Krejčí 2020; Lopes et al. 2020). Rezistentní bakteriální kmeny mohou jednodušeji odolávat vlivu těchto látek a přirozeně nastává takzvaný „seleční tlak antibiotika.“ Při neopatrném či nadměrném užívání těchto antiseptik může být tento jev urychlován. Schéma je zobrazeno na obrázku 3 (Krejčí 2020).



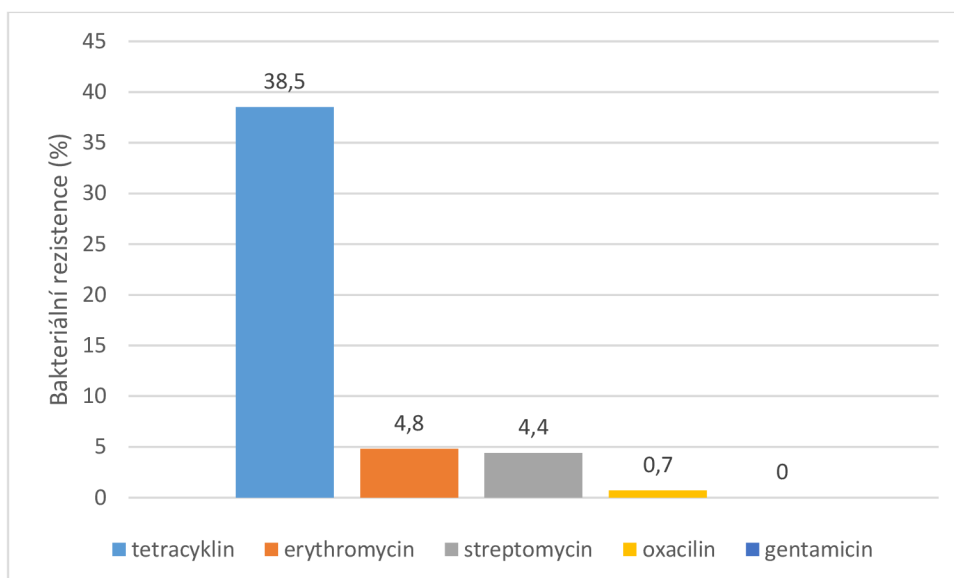
Obrázek 3: „Seleční tlak antibiotika“ (Krejčí 2020)

Antibiotická rezistence u *Str. agalactiae* byla identifikována u sulfatrimetoprimu 50,5 %, u tetracyklinu 46,2 % a u erythromycinu 15,4 %. Míra rezistence u pirlimycinu byla 7,1 %, u penicilinu 3,9 % a u ampicilinu 2,6 %. Obecně byla rezistence *Str. agalactiae* k antibiotikům vyšší než u *Str. dysgalactiae*. Míra rezistence *Str. agalactiae* u vybraných antibiotik je zobrazena v grafu 1 (Denamiel et al. 2005; Kabelitz et al. 2021).

U *Str. dysgalactiae* byla zjištěna 38,5 % rezistence u tetracyklinu; 4,8 % u erythromycinu a 4,4 % u streptomycinu. Rezistence na oxacilin (0,7 %) a GEN (0 %) nebyla skoro patrná. Míra rezistence *Str. agalactiae* na vybraná antibiotika je graficky znázorněna v grafu 2 (Kabelitz et al. 2021).



Graf 1: Rezistence *Str. agalactiae* k vybraným antibiotikům (Kabelitz et al. 2021)



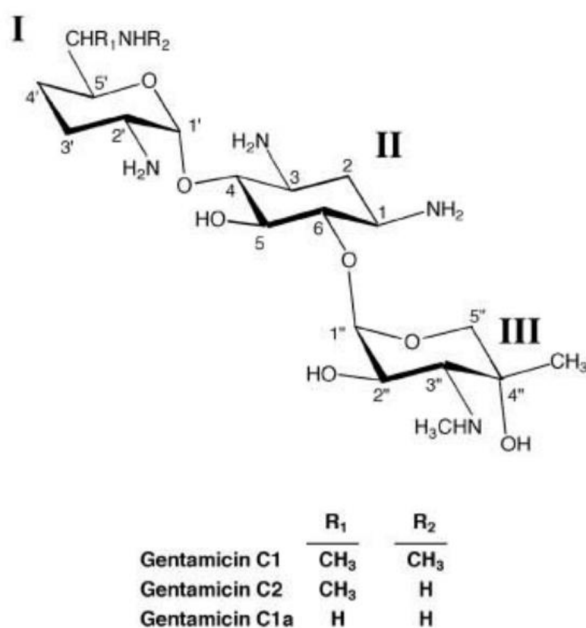
Graf 2: Rezistence *Str. dysgalactiae* k vybraným antibiotikům (Kabelitz et al. 2021)

Rozvoj bakteriální rezistence k antibiotikům nabízí řešení v podobě výzkumu a vývoje nových látek s antibakteriálními účinky, např. z rostlinné říše. Dále je možno zvážit využití kombinačních účinků jednotlivých antibiotik, nebo i alternativních látek s antibakteriálním účinkem (Amyes 2007). Kvůli vysoké míře aplikace antibiotik v mléčném průmyslu se stává rovněž závažným problémem výskyt rezistentních bakterií na antibiotika a reziduí antibiotik vstupujících do potravního řetězce. Až 90 % reziduí antibiotik v mléku pochází z léčby mastitidy. Tato situace si žádá neodkladný a rozsáhlý výzkum v oblasti alternativ antibiotik (Kabelitz et al. 2021).

3.2.1.2 Gentamicin

GEN je aminoglykosidové antibiotikum, jež se hojně užívá při léčbě mastitidy způsobené Gramnegativními bakteriemi. Poprvé byla tato látka izolována v roce 1963 z bakteriálního druhu *Micromonospora purpurea* (Chen et al. 2014; Bustos et al. 2018). GEN patří do skupiny aminoglykosidů (amikacin, plazomicin), které obsahují 4,6 – di-substituovaný deoxystreptaminový kruh (Magnet & Blanchard 2005; Wachino & Arakawa 2012).

Chemická struktura GEN je popsána na obrázku 4. GEN obsahuje 3 glykosidové kruhy, které jsou na sebe napojeny a jsou pro lepší orientaci označené číslicemi I, II a III. Kruh číslo II (2-deoxystreptamin) je typický pro všechny aminoglykosidy a často obsahuje N1 a N3 amino skupiny. U struktury molekuly GEN je typické spojení třetího glykosidového kruhu (III) na šestý uhlík druhého glykosidového kruhu (II). GEN existuje ve třech podobách závisle na druhu jeho substituentů (R_1 , R_2). Tímto způsobem je GEN dělen na GEN C1, C2 a C1a. GEN C1a a C2 se váží na vazebné místo A ribozomálního RNA bakterie s podobnou afinitou. Oproti nim má GEN C1 20krát až 50krát menší afinitu. To může být zapříčiněno metylací 6' amino skupiny a šestého uhlíku. Tím je ztížena rotace okolo šestého uhlíku a dusíku a může být narušena vodíková vazba a elektrostatické interakce mezi amino skupinou a ribozomální RNA (Yoshizawa et al. 1998a).



Obrázek 4: Chemická struktura gentamicinu (Yoshizawa et al. 1998)

Aminoglykosidy (streptomycin, neomycin, amikacin, GEN) jsou širokospektrální antibiotika. Mechanismus účinku těchto látek funguje na základě inhibice syntézy bílkovin. K inhibici bílkovinné syntézy a k chybné translaci dochází tehdy, jakmile se molekuly aminoglykosidu dostanou do bakteriální cytoplazmy. Tyto látky se s vysokou afinitou váží na A-místo 16S ribozomální RNA 30S ribozomu. To má za následek proteosyntézu, která je náchylná k chybovosti. Pro tato antibiotika je nezbytná přítomnost aktivního elektronového

transportu. Proto nejsou aminoglykosidy natolik účinné vůči anaerobním bakteriím (Davis et al. 1986; Davis 1987; Kotra et al. 2000; Krause et al. 2016; Bustos et al. 2018; Pancu et al. 2021).

Bylo zjištěno, že GEN v kombinaci s penicilinem v *in vitro* podmínkách má synergistický efekt. Mechanismus tohoto typu látkové interakce byl zatím pouze popsán u enterokoků. Penicilin inhibuje syntézu buněčné bakteriální stěny, což může zprostředkovávat intracelulární příjem GEN a jeho aktivitu vůči syntéze bílkovin. To může vést až k buněčné smrti (Baker et al. 1981; Swingle et al. 1985; Ruppen et al. 2017). Použití GEN spolu se seskviterpenem *tt*-farnesolem se jeví jako velmi účinné při redukci biofilmu způsobené *S. aureus*. Kombinace těchto látek může být výhodná u bakteriálních kmenů rezistentních na GEN a v prevenci infekcí způsobené *S. aureus* produkující biofilm (Zacchino et al. 2017).

GEN se užívá k léčbě infekcí způsobenými *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter* spp., *Enterobacteriaceae* spp., *Pseudomonas* spp. a *Staphylococcus* spp. Toto antibiotikum může být předepisováno k léčbě bakteriální meningitidy; očním, ušním, kožním či subkutánních infekcí, při infekci kostí, infekční endokarditidě, infekci dýchacích cest či infekci močových cest a mnoho dalších. GEN může být podáván parenterálně (u bakterémie, neonatální sepse, gynekologické infekce, infekce uší a očí), spolu s kolagenní houbou (infekce v místě operačního výkonu), jako laváž (nosní infekce), topikálně (diabetická noha, kožní infekce) či orálně (brucelóza-*Brucella* spp., mor-*Y. pestis*) (Chen et al. 2014). Aminoglykosidová antibiotika se špatně vstřebávají přes gastrointestinální trakt, a tudíž bývají často podávány intravenózně či intramuskulárně (Craig 2011).

Nevýhoda léčby tímto antibiotikem přináší vznik rezistentních bakteriálních kmenů a zvýšenou produkci reaktivních forem kyslíku (ROS). GEN snižuje funkci superoxiddismutázy (SOD) a katalázy (CAT). SOD urychluje dismutázu superoxidového aniontu a enzym CAT spolupracuje na odstranění peroxidu vodíku. Tento stav má za následek zvýšení lipidové peroxidace u leukocytů lidí, což má za následek sníženou imunitu (Bustos et al. 2018).

GEN může být využit k léčbě mastitidy. Jako efektivní se prokázalo podání GEN u mastitidy způsobené bakteriemi *Bacillus* spp., *Corynebacteria* spp., *Klebsiella* spp. (*K. pneumoniae*), *Streptococcus* spp. (*Str. agalactiae* a *Str. dysgalactiae*), *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* a *S. aureus* (Erskine et al. 2002; Martins et al. 2016; Salih & Gibreel 2019).

Nesprávné a nadměrné užívání antimikrobiálních látek může vést ke vzniku rezistentních bakteriálních kmenů a k přítomnosti reziduí antimikrobiálních látek v mléce (Gomes & Henriques 2015). Bohužel GEN není účinný při léčbě mastitidy způsobené rezistentními kmeny bakterií, kterými mohou být zástupci: *Str. agalactiae* (44,43 % bylo rezistentních), *Str. dysgalactiae* (4,87 % bylo rezistentních), *Str. uberis* (27,3 % bylo rezistentních), *S. aureus* (2,31 % bylo rezistentních), koaguláza negativní stafylokoky (1,6 % bylo rezistentních) a *E. coli* (13,53 % bylo rezistentních) (Oliver & Murinda 2012; Martins et al. 2016).

3.2.2 Další přístupy vedoucí k potlačení bakteriálních infekcí

3.2.2.1 Očkování

Mastitida může být způsobena mnoha rody bakterií s rozdílnými vlastnostmi, a proto je zapotřebí rozdílných strategií vakcinace. Vývoj vakcín je zaměřen hlavně na *S. aureus* (Somato-Staph®, Lysigin®), *Streptococcus uberis*, *Salmonella typhimurium* a *E. coli*. Bohužel neexistuje žádná vakcinace proti mastitidě zapříčiněné *K. pneumoniae*. Na trhu je dostupných několik vakcín (v Evropě: Startvac®), ale nejsou dostatečně účinné a jsou dosti nákladné oproti jiným možnostem léčby (Gomes & Henriques 2015; Piepers & de Vliegheer 2018; Cheng & Han 2020; Sharun et al. 2021).

Vakcíny, které jsou zaměřeny na *S. aureus* a *Str. agalactiae* bývají složené z celého mikroorganismu (inaktivované, zapouzdřené nebo nezapouzdřené buňky) nebo z dílčích jednotek (toxiny, extrakt bakteriálního povrchu, hrubý extrakt polysacharidů) (Gomes & Henriques 2015; Cheng & Han 2020). Bohužel na trhu neexistuje žádná účinná vakcína proti *Str. agalactiae*. To je zřejmě zapříčiněné schopnosti kmenů této bakterie modifikovat expresi antigenů povrchu u této bakterie a bakteriální schopností redukovat produkci bílkovin, které ji napomáhají v obranných mechanismech (Armistead et al. 2019; Pinto et al. 2021; Rainard et al. 2021).

Vakcinace u *Str. dysgalactiae* je stále předmětem výzkumu. Nedávno, několik vědeckých skupin testovalo dehydrogenázu a bílkovinný receptor GapC jako možné antigenní očkování. Další možnou vakcinací je chimérická bílkovina, jež se skládá z bílkoviny GapC *Str. dysgalactiae* a dvěma bílkovinami (IsdB a TRAP) bakterie *S. aureus*. Výhoda GapC je ta, že obsahuje vysokou mírou totožných sekvencí napříč bakteriálními druhy (Bolton et al. 2004; Yu et al. 2014; Rainard et al. 2021).

Mastitida může být způsobena řadou mikroorganismů. Nízká účinnost vakcín může být tedy zapříčiněna i multi-etnologickým původem mastitidy. Rovněž postižené místo infekce, či virulence se mohou lišit závisle na bakteriálním kmenu. Kvůli tomu, vakcinace samotná není účinná zvláště u stád s vysokou mírou mastitid. Vakcinace tedy musí být kombinována spolu s dalšími možnostmi léčby. Je nutné nalézt vakcinaci, která bude efektivní i u více bakteriálních kmenů, byla cenově dostupná a bylo ji možné zavést do běžné praxe (Cheng & Han 2020).

3.2.2.2 Rostlinné extrakty

Všechny rostliny produkují primární metabolity, které vykazují nezbytnými vlastnostmi pro jejich přežití jako jsou aminokyseliny, mastné kyseliny (MK), sacharidy a organické kyseliny. Naproti tomu, sekundární metabolity se vyskytují v menším množství a jsou hlavně určeny pro ochranu rostliny a pro zvýšení její konkurenceschopnosti (Lopes et al. 2020).

Rostlinné extrakty vykazují v boji s původci mastitidy slibný potenciál. Účinnost těchto extraktů však závisí na vlastnostech testovaného mikroorganismu. Například, Grampozitivní bakterie jsou více náchylné k těmto látkám než ty Gramnegativní. To je zřejmě zapříčiněno silnou vrstvou lipopolysacharidů v jejich stěně limitující difúzi hydrofobních látek (Lopes et al. 2020). Hlavní výhodou rostlinných extraktů oproti antibiotikům je to, že zpravidla

nevyvolávají rezistenci i při dlouhodobém užívání. Mechanismus účinku fytochemikálií se může lišit od antibiotik, a proto jejich začlenění při léčbě mastitidy může být důležité u prevence tvorby rezistentních bakteriálních kmenů. Dále jsou tyto látky vyhledávány pro jejich antibakteriální, protizánětlivé a imunomodulační vlastnosti (Lopes et al. 2020; Kabelitz et al. 2021; Sharun et al. 2021). Ve srovnání s antibiotickou léčbou mají rostlinné extrakty nižší pořizovací cenu a méně vedlejších účinků. Kvůli tomu je tento způsob považován za dobrou alternativu antibiotické léčby. Jsou však limitující faktory omezující využití těchto extraktů jako: potřeba vysoké míry produkce rostlinné biomasy, nutnost výzkumu toxikologických vlastností a mechanismu účinku rostlinných derivátů, nutnost studia vlivu imunity skotu a mléčných složek a účinnost těchto alternativních antimikrobiálních látek (Mushtaq et al. 2018; Younus et al. 2018; Lopes et al. 2020).

Rostlinné extrakty působí na bakteriální buňku pomocí degradace buněčné stěny, inhibice syntézy nukleových kyselin, inhibice bakteriálních energetických procesů, poškození cytoplazmatické membrány (CPM) a jejich bílkovin, úniku buněčného obsahu, koagulace cytoplazmy a mnoho dalších mechanismů (Cushnie & Lamb 2011; Bustos et al. 2018; Lopes et al. 2020).

Látky, u kterých byla zjištěna antimikrobiální aktivita, zahrnovaly: flavonoidy (extrakt z rostlin *Scutellaria baicalensis*, *Scutellaria lateriflora* vůči *E. coli*), monoterpeny (thymol snižoval expresi zánětlivých cytokinů a inhiboval internalizaci *S. aureus*), taniny (antimikrobiální činnost), polyfenoly (rosveratrol – ochrana vůči oxidativnímu stresu, detoxifikace organismu od ROS a zmírnění mastitidy způsobené LPS) a mnoho dalších (Mushtaq et al. 2018; Cheng & Han 2020; Pancu et al. 2021).

Jako příklad rostlinných extraktů s antimikrobiálními účinky mohou být dále diterpeny (manool, kyselina šřavelová). Kyselina šřavelová potlačuje růst bakterií *Str. agalactiae*, *Str. dysgalactiae*, *S. epidermidis* a *S. aureus*. Další její výhodou je minimální negativní cytotoxický vliv na lidskou buněčnou linii fibroblastů (Fonseca et al. 2013; Gomes & Henriques 2015; Mushtaq et al. 2018).

Rostlinné silice jsou aromatické, lipofilní tekutiny, které se skládají ze směsi těkavých látek o nízké molekulární hmotnosti (Lopes et al. 2020). U těchto látek (skořicová kyselina, eugenol, karvakrol, thymol) byla zjištěna schopnost inhibovat či přímo hubit patogeny mastitidy (*Str. agalactiae*, *Str. dysgalactiae*, *Str. uberis*, *S. aureus*, *E. coli*) (Mushtaq et al. 2018; Cheng & Han 2020). Nejvyšší inhibiční aktivita byla pozorována u silic z rostlin *Satureja Montana*, *Thymus vulgaris* a *Origanum vulgare* vůči testovaným mikroorganismům zahrnující *S. aureus*, *S. chromogenes*, *S. sciuri*, *S. warneri*, *S. xylosus* a *E. coli*. Obsahové látky výše zmíněných rostlin s antimikrobiálním potenciálem jsou zejména thymol, karvakrol a p-cymen. Použití směsi těchto látek měla vyšší účinek než samostatné látky, a proto se jednalo o synergismus (Fonseca et al. 2013). Další esenciální oleje mohou být extrahované například z citrusů (významné látky byly citral, linalool). I nízká dávka (0,05 %) měla za důsledek snížení tvorby biofilmu *S. aureus*, inhibici adheze a invaze *S. aureus* do epiteliálních buněk mléčné žlázy a snížení celkové virulence *S. aureus* (Federman et al. 2016; Cheng & Han 2020). Dále stojí za zmínku, že cinnamaldehyd vykazoval antimikrobiální aktivitu proti *Str. agalactiae*, *Str. dysgalactiae* a *Str. uberis*. Cinnamaldehyd byl schopen snížit bakterie z rodu *Streptococcus* spp. z 10^4 – 10^5 KTJ/ml mléka na nedetekovatelné množství během 12 až 14 hodin působení (Ananda Baskaran et al. 2009; Kabelitz et al. 2021).

U některých rostlin byla zjištěna i *in vivo* účinnost jako například u *Ocimum sanctum*. Její vodný extrakt (prášek z listů 600 mg/kg tělesné hmotnosti po dobu 7 dnů) aplikovaný do mléčné žlázy zvýšil množství neutrofilů, lymfocytů a lysozomálních enzymů v buňkách mléčné žlázy. To mělo za dopad zvýšení imunity mléčné žlázy, snížení PSB a snížení zánětu vemene. Dalšími rostlinami s vysokou antibakteriální aktivitou pozorovanou v *in vivo* studiích byly *Thymus vulgaris* a *Lavandula angustifolia*, které byly vykazovaly aktivitu proti růstu *Streptococcus* spp. a *Staphylococcus* spp. (Lopes et al. 2020).

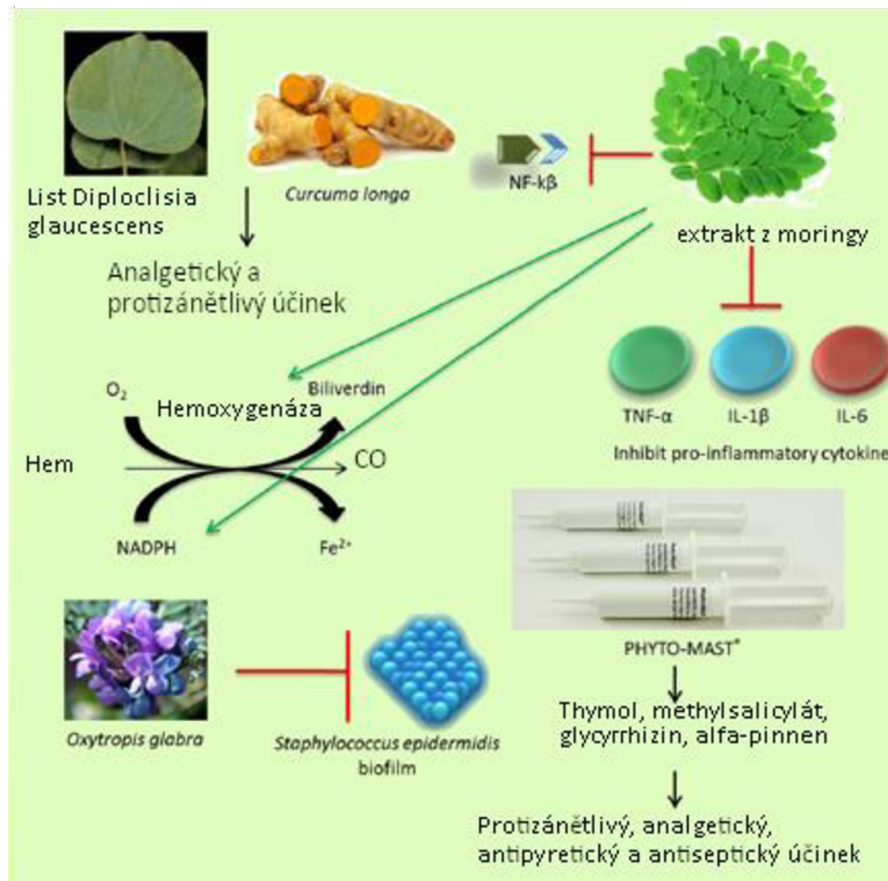
Rovněž byly testovány methanolové extrakty bylinných přípravků obsahující *Diplocclisis glaucescens* listy a kořeny *Curcuma longa* (v poměru 1:1), které vykazovaly analgetickou a protizánětlivou aktivitu. Jejich analgetická aktivita byla srovnatelná s ibuprofenem a indomethacinem (Nisha 2018). Kurkumin, významná složka kurkumy, se osvědčil jako efektivní látka proti mastitidě. Vzdůst zánětlivých faktorů zapříčiněné mastitidou po podání kurkuminu byly sníženy a v místě nákazy se akumulovaly leukocyty. Kurkumin v podání s dalšími rostlinnými látkami (18 % kurkumy, 18 % kůry skořicovníku, 4 % pupenů hřebíčku, 60 % listy rozmarýnu) se snížila míra PSB v mléku, zvýšila se výkrmnost dojníc a produkce mléka (Cheng & Han 2020).

Dalším účinným rostlinným výtažkem v boji proti mastitidě se prokázal extrakt z moringy. Ten mírnil zánětlivé mediátory a podněcoval aktivitu antioxidantních systémů v bovinních epiteliálních buňkách vemene. Zároveň tato látka potlačovala zánětlivé faktory (cytokiny, cyklooxygenáza-2)(Cheng et al. 2019).

Na trhu je možné zakoupit rostlinné extrakty jako například PHYTO-MAST ® (obsahující thymol, methyl salicylát, glycyrrhizin a α -pinen), které jsou obecně považovány jako zdravotně nezávadné americkým úřadem FDA. Látky v těchto přípravcích obsažené mají protizánětlivé, analgetické, antipyretické a antiseptické vlastnosti. I když tento přípravek vykazuje slibným potenciálem, studie vedená Pinedem et al. (2013) nezjistila žádný léčebný efekt ani po 28 dnech aplikace tohoto přípravku.

Dalším produktem na trhu je Mastilep gel a bylinný sprej (AYURVET LTD.) obsahující výtažky z rostlin *Cedrus deodara*, *Curcuma longa*, *Glycyrrhiza glabra* a *Eucalyptus globulus*. I studie zkoumající účinky těchto produktů potvrdila jejich antibakteriální, protizánětlivé, analgetické, antihistaminové a imonomodulační vlastnosti. Zároveň tento přípravek posílil imunitu mléčné žlázy, snížil PSB v mléku a pomohl zvýšit produkci mléka a mléčného tuku (Hase et al. 2013).

Některé látky a jejich efekt je graficky znázorněn níže na obrázku 5 (Sharun et al. 2021).



Obrázek 5: Účinky vybraných rostlinných přípravků (Shraun et al. 2021)

3.2.2.3 Enzymy

Mezi enzymy s prokazatelným antibakteriálním účinkem patří laktoferin (Lf) a β -laktoglobulin, jež jsou proteiny nacházející se v lidském a kravském mléku. Tyto látky vykazují vysoké inhibiční účinky *in vitro* proti *Str. uberis* a *Str. agalactiae* (Kabelitz et al. 2021). β -laktoglobulin je syrovátková bílkovina, která v kombinaci s Lf má aditivní účinek, který je konkrétně účinný proti *S. aureus* (Gomes & Henriques 2015). Lf je bílkovina nespecifické imunity, která je vylučována *in vivo* neutrofily a mléčnou žlázou (O'Halloran et al. 2016). Tato látka vykazuje antibakteriální účinek vůči některým závažným patogenům způsobující mastitidu jako jsou *E. coli*, koaguláza-negativní stafylokoky, *Pseudomonas aeruginosa*, *Str. agalactiae* a *K. pneumonia* (Gomes & Henriques 2015; Cheng & Han 2020). Bylo zjištěno, že Lf až čtyřikrát zvyšuje účinnost penicilinu vůči *S. aureus*. To je zapříčiněné Lf blokadou aktivity β -laktamázy u této bakterie (Petitclerc et al. 2007). Lf má antimikrobiální vlastnosti díky jeho schopnosti vázat na sebe železo, které je nezbytné pro bakteriální a virální replikaci. Nicméně streptokoky nemají vysoké nároky na železo, tudíž jsou účinky Lf u tohoto bakteriálního rodu limitované (Kabelitz et al. 2021). Dokonce druh *Str. uberis* je schopen využít Lf jako pomyslný most mezi jeho povrchem a hostitelským epitelem. To mu umožňuje adhezi, invazi a inkorporaci do bovinních epitelálních buněk (O'Halloran et al. 2016).

Lysozym je bílkovina vyskytující se v mléku, slinách, krevním séru a vejcích. Hydrolyzuje peptidoglykanovou část bakteriální stěny. Byl úspěšně použit pro zvýšení

antibiotické účinnosti proti mastitidě způsobenou *Str. uberis* a *Str. dysgalactiae* (Kabelitz et al. 2021).

Fosfolipáza A2 je protizánětlivá látka, která hostitelským buňkám pomáhá se chránit před destrukcí buněčných membrán. Při napadení *Str. dysgalactiae* se tento enzym podílel na ústupu zánětu a infekce. Bohužel stafylokoky negativní na koagulázu nebyly fosfolipázou A2 ovlivněny. To bylo zřejmě kvůli přítomnosti jeho velmi odolného biofilmu (Seroussi et al. 2018).

3.2.2.4 Imunoterapie

Imunoterapie je alternativní imunologická metoda. U této metody lze využít jednotlivých útvarů nesoucí konkrétní protilátky k bakteriím způsobující mastitidu (*Str. dysgalactiae*, *E. coli*, koaguláza negativní stafylokoky). Může být rovněž použit takzvaný Y komplex zesilující míru fagocytózy. Tento komplex konkrétně výrazně snižoval PSB v mléku a měl vyšší účinnost než některá antibiotika (sulfadiazin, trimethoprim, prokain, penicilin, streptomycin) (Sharun et al. 2021).

Další látkou je interleukin-2 (IL-2), který navyšoval rezistenci epitelálních buněk vůči invazi patogenů. IL-2 však může způsobovat vyšší potratovost (o 7,5 %), což poukazuje na nutnost dalšího výzkumu (Sharun et al. 2021).

3.2.2.5 Organické kyseliny

Organické kyseliny jsou slibnou alternativou antibiotické léčby díky jejich antimikrobiální aktivitě a schopnosti zvyšovat živočišnou produkci (Polycarpo et al. 2017).

Baktericidní účinek MK závisí na délce jejich řetězce a bakteriálním kmenu, na který působí. Obecně MK s delšími řetězci mají nižší antimikrobiální aktivitu. Zároveň je důležité, aby byly tyto látky dostatečně lipofilní a zároveň rozpustné ve vodě k jejich snadné adsorpci na bakteriální stěnu (Nair et al. 2005; Piepers & de Vlieghe 2018). Bylo zjištěno, že přítomnost *cis* dvojných vazeb navyšuje antibakteriální účinek. Dvě dvojně *cis* vazby vykazovaly toxicitu i pro Grampozitivní bakterie. Výskyt třetí dvojně vazby nebyl tak účinný jako přítomnost dvou dvojných vazeb. Kyseliny s volnou karboxylovou kyselinou vykazovaly vyšší antibakteriální aktivitu, než kdyby místo této funkční skupiny byl přítomen ester (Kabara et al. 1972).

Organické kyseliny jsou schopny narušovat bakteriální CPM, ovlivňovat její propustnost a transport živin. Snižením pH v důsledku přítomnosti kyseliny může být způsobena inaktivace vnitrobuněčných enzymů a inhibice transportu aminokyselin (Piepers & de Vlieghe 2018).

Další pozitivní vlastností těchto kyselin (laurová kys.) může být jejich antioxidační aktivita. Tím mohou snižovat poškození tkání či buněk hostitele. Mimo jejich antioxidační vlastnosti, kaprylová a laurová kyselina mají protizánětlivý účinek díky jejich schopnosti inhibovat cyklo-oxygenázu I a II (Piepers & de Vlieghe 2018).

Laurová kyselina (C_{12:0}) měla vysoký bakteriostatický účinek u Grampozitivních organismů zahrnující pneumokoky, streptokoky (skupina A a β-hemolytické), *Corynebacteria*

spp., *Nocardia asteroides* a mikrokoky. Bylo zjištěno, že myristová kyselina (C_{14:0}) inhibovala růst pneumokoků a streptokoků skupiny A. U linolové kyseliny (C_{18:2}) byly zjištěny nízké MIC i u pneumokoků, u β -hemolytických streptokoků a u zástupců skupiny A, *Corynebacteria* spp., *Nocardia asteroides*, mikrokoky a *Candida* spp. (Kabara et al. 1972). Dále bylo zjištěno, že kaprylová kyselina (C_{8:0}) má schopnost inhibovat růst patogenů mastitidy jako *Str. agalactiae*, *Str. dysgalactiae*, *Str. uberis*, *S. aureus* a *E. coli* (Mushtaq et al. 2018). U *S. aureus* byla aktivita této látky snížena, což bylo zřejmě kvůli vrstvě exopolysacharidů či slizu kapsule, které tuto bakterii ochraňují. Gramnegativní bakterie (*E. coli*) jsou vůči MK více odolné než Grampozitivní bakterie (Nair et al. 2005; Piepers & de Vliegher 2018).

Organické kyseliny mohou být začleněny do běžné praxe jako intramamární infuze a mohou i nemusí být kombinovány jako zátky struku během období stání na sucho. Další výzkum *in vivo* účinků těchto látek a jejich potenciálního negativního dopadu na mléčnou žlázu je žádoucí. Rovněž tyto kyseliny mohou negativně ovlivnit organoleptické a funkční vlastnosti mléka. Orální podání těchto látek by nemuselo mít negativní dopad na senzorní vlastnosti mléka, ale zároveň by nemuselo dojít ke zvýšení antimikrobiálních vlastností mléka (Piepers & de Vliegher 2018).

3.2.2.6 Antimikrobiální peptidy

Antimikrobiální proteiny (AMP) jsou různorodé antimikrobiální látky, které hrají důležitou roli v nespecifické imunitě. Tyto látky vykazují aktivitu vůči Grampozitivním a Gramnegativním bakteriím zahrnující některé rezistentní kmeny. AMP izolované z mnohobuněčných organismů (defenziny, katalicidiny) mají hlavně vliv na jejich nespecifickou imunitu. AMP z jednobuněčných organismů (bakteriociny) spíše potlačují aktivitu kompetitivních mikrobiálních druhů. Aplikace AMP je bohužel nákladná kvůli krátkému poločasu rozkladu těchto látek, vysokým nákladům na jejich získání, enzymatické degradaci a cytotoxickým účinkům na eukaryotické buňky (Sharun et al. 2021).

Mechanismy účinků AMP jsou různorodé. Většina eukaryotických AMP tvoří iontové kanálky nebo póry do bakteriální CPM, což způsobí její narušení a změnu elektrického gradientu s následnou ztrátou buněčného obsahu. Dalším mechanismem může být inhibice biosyntézy buněčné stěny. Toho jsou schopné například lantibiotika produkované rodem *Lactobacillus* spp. Tyto látky podněcují angiogenezi, produkci chemokinů, urychlují léčbu a ovlivňují apoptózu v mnohobuněčných organismech (Parisien et al. 2008; Sharun et al. 2021).

Dalším příkladem jsou β -defenziny, které mohou sloužit jako první volba obrany hostitele proti infekci mastitidy. Výsledky studií naznačují, že epiteliální buňky hrají důležitou roli během bakteriální infekce pomocí produkce těchto defenzinů (Parisien et al. 2008; Frutis-Murillo et al. 2019).

Další možností, jak se hostitel brání infekci jsou katalicidiny. Jedná se o AMP produkované neutrofilů, které je ve velké míře uvolňují do mastitického mléka. Tyto látky se dokážou vázat a neutralizovat účinky endotoxinů, čímž pomáhají chránit hostitele. Touto cestou potlačují infekci a regulují obranné mechanismy hostitele. Protože se u zdravých jedinců katalicidiny nevyskytují, jedná se o dobrý specifický biomarker mastitidy. Tyto látky

vykazují slibným potenciálem při léčbě mastitidy způsobené bakteriemi (*S. aureus*, *E. coli*) (Parisien et al. 2008; Langer et al. 2017; Young-Speirs et al. 2018; Sharun et al. 2021)

Bakteriociny jsou bakteriálně derivované antimikrobiální látky s potenciálem nahradit antibiotika. Metabolity BMK *in vitro* vykazovaly antimikrobiální aktivitu vůči *Str. uberis* a *Str. agalactiae*. Nisin, antimikrobiální látka produkovaná druhem *Lactococcus lactis*, má podobné účinky při léčbě mastitidy jako antibiotika. Nisin je schopen tvořit s bakteriální stěnou celek, čímž inhibuje biosyntézu buněčné stěny. Tento komplex dále agreguje, což má za důsledek tvorbu pórů v buněčné stěně a její narušení. V některých zemích je nisin oblíbený ve formě napuštěného ubrousku užívaného při dezinfekci vemene před a po dojení (produkty Wipe Out®, Mast Out®, Nisaplin®) (Cheng & Han 2020; Kabelitz et al. 2021). Bohužel byla zjištěna rezistence *S. aureus* k nisinu a tudíž je důležité nalézt další bakteriociny či kombinaci antibakteriálních látek, které by byly v kombinaci s nisinem účinné. Touto látkou může být například lysostaphin produkovaný *S. simulans*, jež v kombinaci s nisinem inhibuje *S. aureus* (Cheng & Han 2020).

Bovicin HC5 je bakteriocin produkovaný ruminální bakterií kmene *Str. equinus* HC5. Tento AMP je účinný vůči většině streptokokálním a stafykokálním kmenům způsobující mastitidu. Bohužel ale nebyly schopny potlačit růst *E. coli*, a tudíž tato látka není považována za plnohodnotnou alternativu antibiotik (Godoy-Santos et al. 2019; Sharun et al. 2021).

3.2.2.7 Bakteriofágy

Bakteriofágy jsou skupina virů se schopností napadat a zabíjet bakterie. Výhodou těchto mikroorganismů je jejich exponenciální replikace a zacílení na specifické druhy. Bakteriofágy a jejich deriváty (endolyziny, exolyziny, depolymerázy...) mohou tedy být použity jako zbraň proti potenciálně patogenním bakteriím s nulovou hrozbou pro zdraví hostitele (Cheng & Han 2020; Sharun et al. 2021).

Tyto mikroorganismy mohou být užitečné v zásahu proti bakteriím tvořícím biofilmy a jako prevence antibiotické rezistence. Dále cílí pouze na konkrétní bakterie, takže neexistuje riziko vytlačování žádané mikrobioty (Parisien et al. 2008). I když mají bakteriofágy tolik pozitivních vlastností, většina z nich jsou v prostředí nestabilní a jejich skladování může být komplikované (Sharun et al. 2021).

U léčby mastitidy je důležité, aby specifické bakteriofágy byly transportovány do mléčné žlázy a jejich aktivita zůstala neměnná i po kontaktu se syrovým mlékem. Výzkum léčby mastitidy bakteriofágy je zaměřen především na inhibici *S. aureus* a je potřeba jej rozšířit i na další původce mastitid, zejména na streptokoky (Dias et al. 2013; Kabelitz et al. 2021; Sharun et al. 2021).

Další možností je využití více typů bakteriofágů (tzv. fágový koktejl) místo pouhého jednoho typu. V *in vivo* modelu na myších, tento koktejl měl za následek vysoký fágový titr oproti využití pouze jednoho typu fágu a vykazoval vysokou účinnost léčby. Konkrétně inhibice růstu *E. coli* a její adheze na hostitelské epiteliální buňky byla srovnatelná s antibiotickou léčbou (ceftiofur). Rovněž u této metody se snižuje pravděpodobnost tvorby rezistence bakterií vůči konkrétním typům bakteriofágů (Parisien et al. 2008; Porter et al. 2016; Cheng & Han 2020; Sharun et al. 2021).

Z bakteriofágů je možné získat endolysin, které jsou účinnými proti Gram-pozitivním bakteriím. Jedná se o proteiny, které umožňují fágovi degradovat peptidoglykanovou vrstvu buněčné stěny. Díky tomu může fág uniknout z bakteriální buňky během jeho lytického cyklu. Konkrétně CHAP_K, bakteriofágová peptidáza, je účinná proti stafylokokům tvořící bofilmy. *In-vitro* studie naznačují, že by tato látka mohla být využívána v boji proti kolonizaci povrchu vemene *S. aureus* (Fenton et al. 2013; Gomes & Henriques 2015; Sharun et al. 2021).

3.2.2.8 Probiotika

Mikrobiota, neboli společenství veškerých mikroorganismů na konkrétním místě, tvoří složitý dynamický ekosystém. Mikrobiota má vysoký dopad na hostitelský metabolismus a zahrnuje jak komenzály, tak i mikroorganismy, které mohou zapříčinit infekci (Gill et al. 2006). Mikrobiota vemene a její skladba je tudíž velmi podstatná. Je logické, že narušení mikrobiální diverzity u mléčné žlázy má přímý dopad na mastitidu, kdy se mikrobiota infikovaného vemene zřetelně liší od zdravého. Dojnice, které prodělaly mastitidu, mohou prokazovat odlišnou skladbu mikrobioty a být náchylnější k dalším incidencím mastitidy (Kabelitz et al. 2021; Sharun et al. 2021). Běžná mikrobiota vemene je složena z rodů *Ruminococcus* spp., *Oscillospira* spp., *Roseburia* spp., *Dorea* spp., *Prevotella* spp., *Bacteroides* spp., *Paludibacter* spp. a *Bifidobacterium* spp. Při zranění či vrozené anomálii mléčné žlázy, hrozí jí expozice mikrobům z okolí (Sharun et al. 2021).

Probiotika jsou živými mikroorganismy. Ve „vhodném množství“ vykazují slibným potenciálem pozitivně ovlivňovat zdravotní stav hostitelského organismu. Jejich pomocí může být pozměněna mikrobiální skladba u hostitele a tím i zlepšen jeho zdravotní stav. Aby konkrétní mikroorganismus byl schválen jako probiotický, existuje řada potřebných kritérií, které musí splňovat: vyčerpávající definici, pozitivní dopad na zdraví a metabolismus hostitele, či antagonistickou aktivitu vůči patogenům. Dále musí být prokázána jeho kompletní bezpečnost, schopnost přežít v uspokojivém množství v prostředí cílového organismu, a odolnost k technologickým postupům. Zároveň by tyto mikroorganismy neměly u hostitele zapříčinit infekci (FAO/WHO 2001; Jouany & Morgavi 2007; Hill et al. 2014).

Hlavními produkty střevních bakterií jsou lipopolysacharidy (LPS) a krátké MK. Zvýšená syntéza LPS má za následek, že se více těchto látek dostane krví až k mléčné žláze a tím se zvýší propustnost krevní bariéry a má negativní dopad na zánět mléčné žlázy. Naproti tomu zvýšená produkce krátkých MK má protektivní účinek na tuto žlázu. Krátké MK jsou produkovány i ruminální mikrobiotou (Sharun et al. 2021).

Bakterie mléčného kvašení (BMK) jsou hojně využívány proti mastitidě kvůli jejich imunomodulační aktivitě. Mohou být použity jako krmné aditivum, k topickému ošetření struku či jako inokulant do vemene. Tyto bakterie kolonizují vemeno dojnice a vytváří u něj ochranný biofilm, který zabraňuje růstu patogenů způsobujících mastitidu. Začlenění BMK do krmení dojnic je zvažováno jako účinná metoda prevence mastitidy (Sharun et al. 2021).

Adheze BMK k epiteliálnímu povrchu napomáhá prevenci invaze patogenních bakterií. Konkrétně *Lactobacillus brevis* 1595, *L. brevis* 1597, *L. plantarum* 1610 vykazovaly vysokou schopnost kolonizace bovinních epiteliálních buněk mléčné žlázy (Bouchard et al. 2015).

L. lactis subsp. *lactis* CRL 1655 a *L. perolens* CRL 1724 dobře kolonizují povrch mléčné žlázy a vykazují inhibiční aktivitu vůči patogenům mastitidy svou agregací (Pellegrino et al. 2018; Cheng & Han 2020). Bylo zjištěno, že *L. casei* u epiteliálních buněk napadené mastitidou redukovaly expresi zánětlivých faktorů (IL-6, IL-8, IL-1 α , IL-1 β či TNF- α). Rovněž tento druh zamezoval invazi epiteliálních buněk *S. aureus* tím, že inhiboval adhezi a/nebo internalizaci *S. aureus* (Gomes & Henriques 2015; Sharun et al. 2021). Inokulace *L. lactis* do mléčné žlázy během období stání na suchu se jevila jako pozitivní zásah díky nálezům zvýšených hladin imunoglobulinů v kravském mléce i v krvi. To vyazuje, že BMK stimulují lokální a systematickou imunitní odpověď (Pellegrino et al. 2017; Angelopoulou et al. 2019).

Během období stání na suchu u dojníc je vyšší riziko vzrůstu nových případů mastitidy. Oproti období laktace, ve struku neproudí žádné mléko a chybí keratinová zátka struku. Je tedy vyšší pravděpodobnost nákazy mastitidou – až 5,5krát. Jako slibná alternativa se jeví zátka struku, která fyzicky zamezuje vstupu patogenů do mléčné žlázy (Hogan & Smith 2003; Kabelitz et al. 2021). BMK jsou vhodné jako prostředek na ošetření struků dojníc. Je dokonce účinnější u snížení PSB oproti konvenčním přípravkům (na bázi jódu, sodium hypochlorát, dodecyl benzen sulfonová kys., chlóru, chlorhexidinu, fenolických látek či alkoholů) a je u něj jistota, že nezanechává rezidua v mléce (Yu et al. 2017). Tyto BMK prostředky mají další výhodu, že BMK soupeří o kolonizaci strukového kanálku s mastitickými patogeny a vytlačují je (Sharun et al. 2021). Aplikace *Weissella cibari* a *W. confusa* jako způsob ošetření vemene podle studie z roku 2016 (Serna-Cock & Pabón-Rodríguez) a z roku 2012 (Cock et al.) mají probiotický účinek a potlačují růst *S. aureus* a *Str. agalactiae*.

3.2.2.9 Nanočástice

V posledních letech se jako o jedné z alternativ antibiotik uvažuje i o nanočásticích (Kabelitz et al. 2021). Tyto látky jsou velmi účinné při léčbě multirezistentních bakterií, které vykazují hrozbu společnosti. Ve větším měřítku bohužel mohou poškozovat orgány hostitele a způsobovat patologické změny. Další studie jsou tedy potřebné ke zjištění jejich biologického účinku (Sharun et al. 2021).

Baktericidní vlastnosti kovových nanočástic ze stříbra, zlata či mědi čerpají z jejich schopnosti ničit buněčné membrány, denaturovat bílkoviny, degradovat DNA a tvořit ROS (Kabelitz et al. 2021). Komerčně dostupné nanočástice stříbra a mědi *in vitro* snižují životaschopnost *S. aureus* a *E. coli*, aniž by byly pro hostitele toxické (Gomes & Henriques 2015; Sharun et al. 2021).

U léčby mastitidy byly zjištěny příznivé výsledky u nanočástic stříbra, mědi, chitosanu, propolisu a kationické kombinace nisinu a lipidu (Cheng & Han 2020; Sharun et al. 2021). Přímá infuze chitosanu do mléčné žlázy měla za následek posílení nespecifické imunity hostitele, zvýšené koncentrace sérového albuminu, Lf a laktát dehydrogenázy. To má za dopad snížení pravděpodobnosti onemocnění mastitidou (Cheng & Han 2020). Nanočástice stříbra spolu s antibiotiky inhibujícími proteosyntézu (erytromycin, GEN, streptomycin, doxycykline) vykazovaly synergistickým efektem (Ahmadi et al. 2014; Gomes & Henriques 2015).

Kombinace quercetinu a stříbra vykazuje silné antibakteriální vlastnosti spolu s inhibicí tvorby biofilmu multirezistentní *E. coli*. Kurkumin, polyfenol získaný z kurkumy, se rychle degraduje v ústech a tím je snížena jeho protizánětlivá aktivita. V kombinaci s nanočásticemi se však zvyšuje jeho biodostupnost a mnohem více snižuje zánětlivé faktory spojené s mastitidou (Sharun et al. 2021).

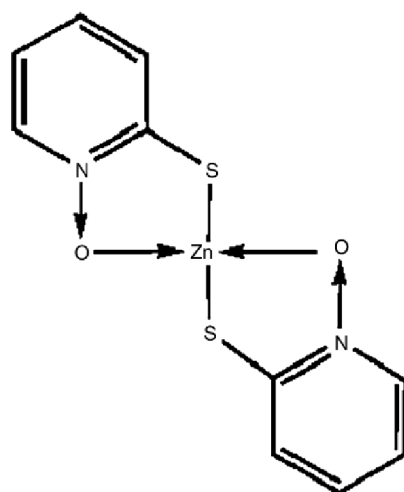
U nanočástic NO byl zjištěn příznivý vliv na inhibici *S. aureus* a obecně by tato látka mohla být využívána jako léčba a prevence bovinní mastitidy. Další výhodou je nízká výrobní cena a bezpečnost, což přispívá k možnosti jej využít jako alternativu k překonání vzniku bakteriální rezistence (Gomes & Henriques 2015).

3.2.3 Pyrithion zinek

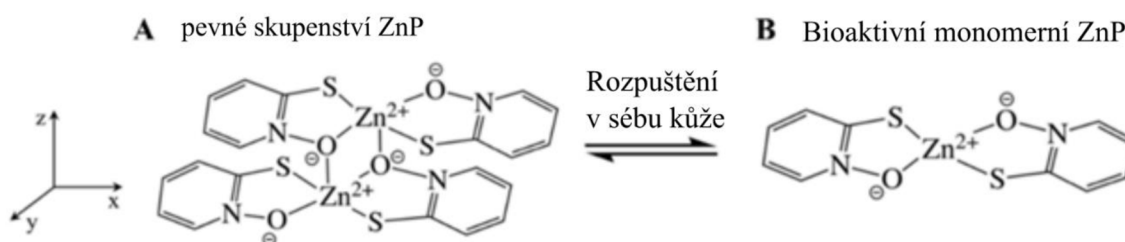
Pyrithion zinek (ZnP) je derivát aspergilové kyseliny vykazující slibný antimikrobiální potenciál. Ze studií nebylo zjištěno, že by ZnP znamenal nebezpečí pro lidskou pokožku či že by měl potenciál být jejím primárním iritantem (Shaw et al. 1950; Pansy et al. 1953; Klingsberg & Newkome 1960; Chandler & Segel 1978; Imokawa et al. 1981; Lamore et al. 2010; Mangion et al. 2021). Bylo zjištěno, že absorpce ZnP po aplikaci této látky na pokožku opic byla pouhých 0,2 %. Koncentrace této látky v krevním řečišti opic po topikální aplikaci nebylo ani možné detekovat (Gibson & Calvin 1978; Wedig & Maibach 1981; Guthery et al. 2005).

Tato látka je často obsažena v dermatologických produktech jako jsou krémy, šampony a spreje. ZnP je často vyhledáván jako aktivní látka ke snížení incidence lupů (koncentrace 1-2 % Head & Shoulders, Procter & Gamble, Cincinnati, Ohio), chronické ložiskové psoriáze (mast o koncentraci 0,25 % ZnP) a seboroické dermatitidy (koncentrace 1 %) a při vypadávání vlasů (zdroj zinku) (Shaw et al. 1950; Imokawa et al. 1981; Chandler & Segel 1978; Lamore et al. 2010; Sadeghian G. et al. 2011; Gupta et al. 2014; Mangion et al. 2021).

Aspergilová kyselina je přírodní antibiotikum produkované druhem *Aspergillus flavus*. Tato látka obsahuje cyklickou kyselinu hydroxamovou, jež je funkční skupinou v pyrazinovém jádru. Z aspergilové kyseliny byla v roce 1950 syntetizována nová látka, jež je N-hydroxy-2-pyridinthion (HPT). Ten vykazoval vysokou antimikrobiální aktivitou (*Aspergillus* spp., *Candida albicans*...) a byl schopen inhibovat růst *S. aureus*. ZnP je chelát HPT. Centrální atom zinku se pojí vazbami s kyslíkem a sírou 2 pyridinových kruhů. Chemická struktura ZnP je vyobrazena na obrázku 6 (Guthery et al. 2005; Park et al. 2018). ZnP je slabě rozpustný ve vodě (5-15 ppm) (Scientific Committee on Consumer Safety 2020). Kvůli tomu je kůže hůře propustná pro tuto látku a ZnP se na ní deponuje a jeho aktivita je zaměřena vůči mikroorganismům vyskytujících se na lidské pokožce. Dimerická nerozpustná forma ZnP se za pomoci séba pokožky rozkládá na bioaktivní monomerní formu, která má antimikrobiální vlastnosti. Schéma tohoto jevu je popsáno na obrázku 7 (Mangion et al. 2021).



Obrázek 6: Chemická stavba ZnP (Guthery et al. 2005)



Obrázek 7: Formy ZnP (Mangion et al. 2021)

Antimikrobiální aktivita ZnP může být založena na mnoha mechanismech. Pyrithion je známý jako iontový přenašeč zinku a může navyšovat hladinu zinku v buňkách kvasinek, která vede až k buněčnému stresu mikroorganismu. To je jen jeden z principů antimikrobiální aktivity ZnP. Rovněž nadměrná akumulace zinku v buněčném prostoru způsobuje mitochondriální dysfunkci, která je spjata s akumulací ROS v této organelle, narušení elektronového transportního řetězce, snížení glykolýzy a redukci produkce ATP. Dále bylo zjištěno, že gen *SOD2*, superoxiddismutáza odpovědná za snížení hladiny ROS v *M. restricta*, je přímo či nepřímo inhibován ZnP (Park et al. 2018).

Další způsob antimikrobiální aktivity může být za pomoci zvýšených hladin rtuti v buňce. K tomu dojde zřejmě během reakce chelatace ZnP mědi a vzniku pyrithionu mědi. Nadměrné množství mědi v mikrobiální buňce může inaktivovat enzym akonitázu, který je zapojen v mitochondriální produkce energie (Chandler & Segel 1978; Imokawa & Okamoto 1982; Gelling et al. 2008; Lamore et al. 2010; Lamore & Wondrak 2011; Reeder et al. 2011; Mangion et al. 2021). Deplece ATP v buňce je způsobena přímou či nepřímou depolarizací CPM ZnP a tím inhibicí protonových pump, které dodávají energii do buňky. Blokací protonové pumpy ZnP dochází k omezení membránového transportu u mikroorganismů (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *M. restricta*) (Imokawa et al. 1981; Guthery et al. 2005; Lamore et al. 2010; Lamore & Wondrak 2011; Gupta et al. 2014; Park et al. 2018; Mangion et al. 2021). Dále bylo pozorováno u *M. restricta* redukováná exprese lipázy ZnP, která je nezbytná pro

degradaci lipidů a ovlivnění exprese genů pro dílčí části Krebsova cyklu (sukcinát dehydrogenáza, citrát syntáza...) a elektronového transportního řetězce (podjednotka ATP syntázy). Těmito několika mechanismy nabývá ZnP na své antimikrobiální aktivitě (Park et al. 2018; Mangion et al. 2021).

Dále Yasokawa et al. (2010) studoval buňky *Saccharomyces cerevisiae* ošetřené ZnP a zjistil, že tato látka zvyšuje expresi genů zodpovědných za transport železa. To má za důsledek nedostatek železa pro tyto mikroorganismy. Studie vedená Reederem et al. (2011) dále zjistila vliv ZnP na snížení aktivity CTR1, což je transportér s vysokou afinitou k mědi přítomný v plazmatické membráně. To mělo za následek zvýšené hladiny mědi, které mohou být cytotoxické.

Studie vedená Blanchardem et al. (2016) zjistila, že ZnP byl účinný při inhibici růstu *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *A. baumannii*, *E. faecium*, *E. faecalis* a *E. cloacea*. Kombinace této látky spolu s dalšími antimikrobiálními topikálními přípravky by mohlo být více účinné než užití jich samotných. Konkrétně aplikace sulfadiazinu stříbrného a ZnP měla adiční účinek (Blanchard et al. 2016). Dalším, již zmíněným mikroorganismem, jehož růst ZnP inhibuje jsou kvasinky druhu *Malassezia restricta*. Ty jsou považovány za hlavní příčinu výskytu lupů. Přípravky s přidavkem antifungálních látek jako je například ZnP se osvědčily jako velmi účinné (Park et al. 2018).

In vitro antimikrobiální aktivita ZnP byla shrnuta z více studií článkem vydaném Guthery et al. (2005) (tabulka 4).

Tabulka 4: Antimikrobiální aktivita ZnP (Guthery et al. 2005)

Testovaný organismus	Počet kmenů	MIC 50 v ppm	MIC 90 v ppm
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	10	10
Koaguláza negativní stafylokoky ^A	10	10	10
<i>Enterococcus</i> spp. ^B	10	20	20
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 19433	10	20
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778	10	10
<i>Sarcina lutea</i>	ATCC 9341	10	20
<i>E. coli</i>	10	10	10
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 9920	10	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NCIMB 10548	ND	13
<i>Citrobacter</i> spp. ^C	10	20	40
<i>Serratia marcescens</i>	10	20	40
<i>Morganella morganii</i>	5	40	150
<i>Enterobacter</i> spp. ^D	10	20	20
<i>Klebsiella</i> spp. ^E	10	20	20
<i>Dermatophytes</i> spp. ^F	5	10	10
<i>Aspergillus</i> spp. ^G	5	10	10
<i>Candida</i> spp. ^H	5	10	10

Vysvětlivky: ^A obsahovalo *S. epidermidis* (4 kmeny), *S. hominis* (1 kmen), *S. saprophyticus* (3 kmeny), *S. simulans* (2 kmeny)
^B *E. faecalis* (5 kmenů), *E. faecium* (2 kmeny), *E. avium* (1 kmen), *E. durans* (1 kmen), *E. raffinosus* (1 kmen)
^C *C. diversus* (6 kmenů), *C. freundii* (4 kmeny)
^D *E. cloacea* (7 kmenů), *E. aerogenes* (3 kmeny)
^E *K. xyotoca* (2 kmeny), *K. pneumoniae* (8 kmenů)
^F *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentahrophytes*, *T. rubrum*, *Trichophyton* spp.
^G *A. flavus* (2 kmeny), *A. fumigatus* (2 kmeny), *A. terreus* (1 kmen)
^H *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*
 ND = neexistující data

3.3 Typy interakcí antimikrobiálních látek

Klasifikace interakce látek mezi sebou poskytuje přehled ohledně toho, jak předpovídat jejich vlastnosti, jak je detekovat a vyvarovat se jim. Tímto způsobem mohou být klasifikovány: farmaceutické interakce, farmakokinetické (absorpce, distribuce, metabolizace, exkrece) a farmakodynamické. Farmakodynamické interakce se mohou dělit na 1) přímý účinek na funkci receptoru, 2) interference s biologickými či fyziologickými pochody a 3) aditivní/synergický/antagonistický účinek. Tyto interakce mohou být i mezi léčivem a onemocněním. Bohužel i jednou z možností, jak léčivo může ovlivňovat nemoc je tvorba antimikrobiální rezistence. To je dalším důvodem, proč studium antimikrobiálních látek a jejich interakcí, je nezbytné (Aronson 2004; Caterina et al. 2013).

Faktory, které mohou měnit absorpci léčiv je změna pH. Léčiva, která jsou schopna navýšit žaludeční pH mohou ovlivňovat kinetiku i dalších látek. Těmito léčivy mohou být antacidy, inhibitory protonové pumpy či H₂ antagonisty (hydroxid hlinitý, soda bikarbona). Navýšení gastrického pH může ovlivňovat ostatní látky jako snižovat jejich biodostupnost či navyšovat jejich absorpci (beta blokátory). Na rozdíl od zvýšení pH, některé látky mohou pH snižovat. Příkladem je pentagastrin, který snižuje pH žaludku (Caterina et al. 2013).

Další faktor modifikující absorpci látek je tvorba špatně rozpustných komplexů. Tetracykliny v zažívacím traktu se mohou vázat s ionty kovů (vápník, hořčík, hliník, železo) či s jinými léčivy (antacidy, látky obsahující kovy) a tím je snížena jeho absorpce. Obdobným způsobem antacidy snižují absorpci fluorochinolonů (ciprofloxacin) a tetracyklinů, protože ionty kovů tvoří komplexy s léčivem. Kvůli tomuto jevu, by antacidy a fluorochinolony měly být podávány s minimálním intervalem 2 hodin od sebe (Ogawa & Echizen 2011; Seedher & Agarwal 2010; Caterina et al. 2013).

Většinou jsou léčiva distribuována v organismu vazbou na plazmatické či tkáňové bílkoviny. Nejvýznamnější plazmatickou bílkovinou je albumin, glykoproteiny a lipoproteiny. Pouze nenavázané látky jsou k dispozici pro pasivní difúzi extravaskulárním či tkáňovým lokalitám a často určují koncentraci látky u aktivního místa, a tedy i její účinnost. Konkrétně albumin má 5 možných vazebných míst. Míra vazby léčiva na tuto plazmatickou bílkovinu

závisí na množství volných a vázaných molekul a její afinitě k dané bílkovině (Krach-Hansen et al. 2002; Bushra & Aslam 2010; Caterina et al. 2013).

Synergie je definovaná jako účinek dvou nebo více látek, které působí v kombinaci vyšší než očekávaný aditivní účinek těchto látek. Kombinace takových látek může umožnit kýžený terapeutický účinek se snížením nežádoucích vedlejších účinků. U tohoto jevu by rovněž mohlo být možné využívat nižší množství léčiv se stejným efektem (Greco et al. 1996). Antagonismus je opak synergie. Při kombinaci látek dochází tedy ke snížení účinků látek v kombinaci. V oblasti biochemie je tento jev často vnímán negativně, protože dochází k zeslabení účinků podávaných látek. Spotřeba dotyčných látek vzrůstá, i když jejich účinnost klesá (Tallarida 2001).

Z důvodu rozšířené antimikrobiální rezistenci u patogenů zapříčiňující mastitidu, je důležité nalézt vhodné interakce možných látek na potlačení této infekce. Studie vedená Rajamanickamem et. al. (2020) našla pozitivní interakce využití hojně používaného antibiotika ceftioforu a fosfatidylcholinu. Tyto látky měly synergistický účinek u *Staphylococcus* spp. a aditivní/synergistický u *S. epidermidis*. Další studie poukázala na synergii cefalexinu a kanamycinu (aminoglykosid) u *S. aureus*, *Str. uberis* a *E. coli* (Ganière y Denuault 2009).

4 Metodika

4.1 Materiál

4.1.1 Testované látky

V tabulce níže 5 jsou uvedené jednotlivé zkoumané antiseptické látky a jejich vlastnosti.

Tabulka 5: Rozpustnost testovaných látek

Zkoumané látky			
	Účinnost	Rozpustnost	Dodavatel ATB
Pyrithion zinek	100 %	DMSO	Sigma-Aldrich (Praha, ČR)
Gentamicin	100 %	Destilovaná voda	Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

Vysvětlivky:

ATB = antibiotikum

DMSO = dimethylsulfoxid

4.1.2 Bakteriální kmeny a podmínky kultivace

Testované kmeny mikroorganismů jsou uvedené v tabulce 6 a zahrnují zástupce streptokoků, jež jsou spjaty s bovinní mastitidou. K inokulaci byla použita suspenze daného kmene mikroorganismů. Densi-La-Meter II založeném na McFarlandově zákalové stupnici byl použit pro úpravu hustoty dané suspenze. Výsledná hodnota byla $5 \cdot 10^5$ KTJ/ml (KTJ=kolonie tvořící jednotky). K růstu *Str. agalactiae* bylo použito médium Tryptone Soya Broth (Oxoid, Velká Británie) a pro *Str. dysgalactiae* bylo použito stejné médium s přidavkem kvasničného extraktu (3 $\mu\text{g/ml}$; Sigma Aldrich, ČR). Tabulka 7 pojednává o vlastnostech příslušného kultivačního média.

Tabulka 6: Testované kmeny bakterií

Bakteriální druh	Kmen	Původ sbírky
<i>Str. agalactiae</i>	CCM 6187	Masarykova univerzita, Brno, ČR
<i>Str. dysgalactiae</i>	DSM 20662	Braunschweig, Německo

Tabulka 7: Složení média Tryptone Soya Broth (Oxoid, Velká Británie)

Složení	Koncentrace ($\mu\text{g/ml}$)
Pepton z kaseinu	17,0
Enzymaticky štěpené sójové boby	3,0
Chlorid sodný	5,0
Hydrogenfosforečnan sodný	2,5
Glukóza	2,5

4.2 Testování minimálních inhibičních koncentrací gentamicinu a pyrihion zinku

K přípravě počátečních koncentrací testovaných antiseptik za účelem určení MIC byla uplatněna standardizovaná metodika CLSI (2013) modifikovaná dle nejnovějších znalostí Cos et al. (2006) s využitím mikrodiluční bujónové metody za *in vitro* podmínek. K tomu byly použity destičky o devadesáti šesti jamkách určené k mikrotitraci. V těchto tabulkách byly vytvořeny klesající ředící řady zásobních roztoků testovaných látek s počátečními koncentracemi viz tabulka 8. Do všech jamek bylo nabráno po devadesáti mikrolitrech roztoku testovaného antiseptika spolu s konkrétním médiem pro daný bakteriální druh. Poté byly tyto tabulky zaočkovány deseti mikrolitry suspenze bakterií a dány k inkubaci za daných podmínek (24 hodin, 37 °C, aerobní podmínky).

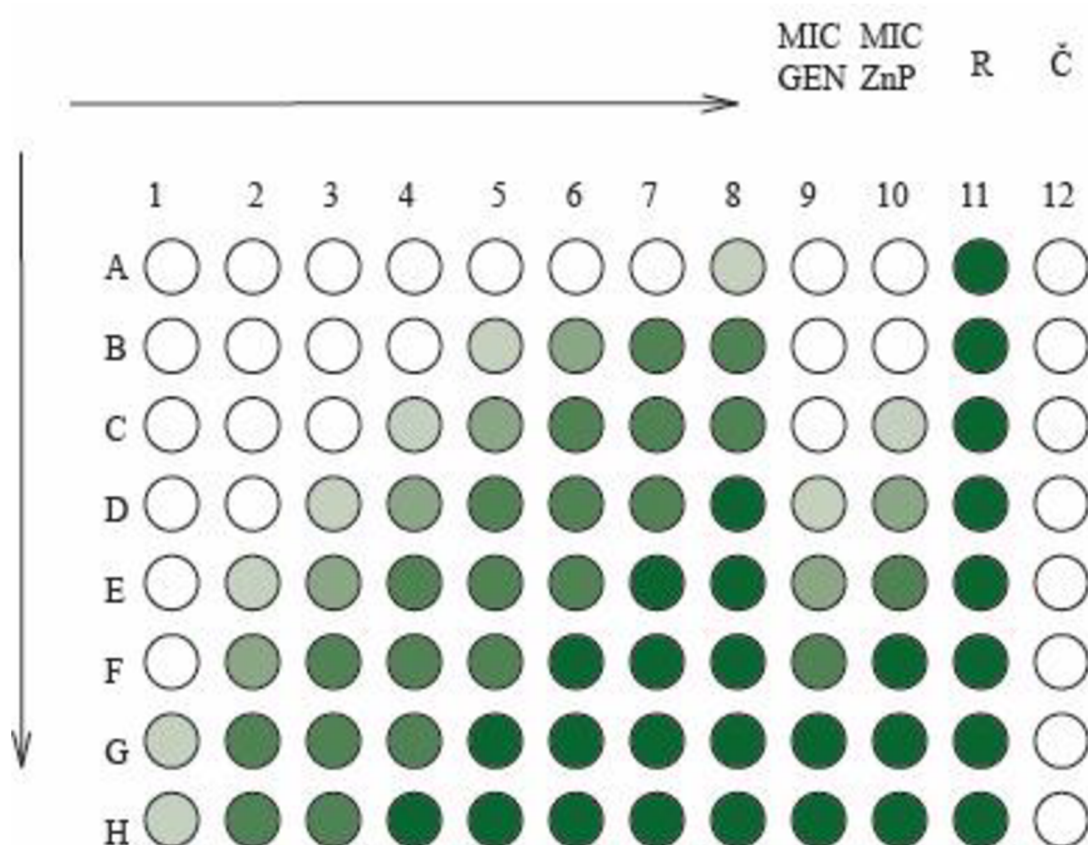
Zákal ve všech jamkách mikrotitrační destičky byl posuzován spektrofotometricky za pomoci Infinite® 200 PRO Microplate Reader (Tecan, Švýcarsko). Použitá vlnová délka měření byla 405 nm. Toto měření sloužilo k posouzení nárůstu mikroorganismů na daných destičkách. Jako hodnoty MIC byly stanoveny nejnižší registrované koncentrace testovaných látek zapříčiňující osmdesát procent úbytku mikrobiálního růstu oproti kontrole (= R (růst) – pouze médium + bakteriální inokulum). Triplikáty všech vzorků byly vyhodnoceny ve třech nezávislých experimentech. Výsledné hodnoty MIC byly stanoveny jako aritmetické průměry všech měření.

Tabulka 8: Počáteční koncentrace antiseptik u konkrétních bakteriálních kmenů

Testovaný bakteriální kmen	Látka	Počáteční koncentrace (µg/ml)
<i>Str. agalactiae</i> (CCM 6187)	Gentamicin	8
	Pyrihion zinek	0,5
<i>Str. dysgalactie</i> (DSM 20662)	Gentamicin	4
	Pyrihion zinek	2

4.3 Posouzení typů interakcí gentamicinu v kombinaci s pyrihion zinkem

Hodnoty MIC přispěly k určení typů interakcí kombinace GEN a ZnP v reakci s testovanými bakteriálními kmeny. V mikrotitrační destičce vzniklo celkem šedesát čtyři rozdílných kombinací (viz obrázek 8), které byly dále použity pro determinaci indexů frakčních inhibičních koncentrací (FIC). Tyto kombinace vznikly napipetováním osmi sériových ředění GEN z horizontálních řad této destičky s navazujícím křížovým ředěním, jehož bylo docíleno napipetováním osmi sériových ředění ZnP z vertikálních řad. Tyto tabulky byly zaočkovány deseti mikrolitry inokula bakterií a dány k inkubaci za daných podmínek (24 hodin, 37 °C, aerobní podmínky).



Obrázek 8: Výsledná mikrotitrační destička a její vzhled

Vysvětlivky:

MIC GEN-minimální inhibiční koncentrace gentamicinu

MIC ZnP-minimální inhibiční koncentrace pyrithionu zinku

R-růst (bakteriální kultura bez antimikrobiálních látek)

Č-čistota (pouze médium)

4.4 Stanovení frakčních inhibičních koncentrací gentamicinu a pyrithion zinku

Zákal ve všech jamkách mikrotitrační destičky byl posuzován spektrofotometricky za pomoci Infinite® 200 PRO Microplate Reader (Tecan, Švýcarsko). Použitá vlnová délka měření byla 405 nm. Toto měření sloužilo k posouzení nárůstu mikroorganismů na daných destičkách.

Pomocí níže uvedeného vzorce využívající hodnoty MIC byly stanoveny hodnoty FIC.

$$FIC_{BA} = \frac{MIC_B (kombinace)}{MIC_B (samostatná)} + \frac{MIC_A (kombinace)}{MIC_A (samostatná)}$$

Ze zjištěných indexů FIC lze stanovit následující druhy interakcí. Podle výše jejich hodnot může být jejich vztah stanoven jako: antagonický účinek při $FIC > 4$; indiference při $0,5 \leq FIC \leq 4$; a synergismus při $FIC \leq 0,5$ (Odds 2003).

5 Výsledky

Získané hodnoty MIC a hodnoty FIC ZnP a GEN u *Str. agalactiae* (CCM 6187) a u *Str. dysgalactiae* (DSM 20662) jsou zaznamenané v tabulkách 9 a 10.

Mezi hodnotami MIC ZnP a GEN u jednotlivých bakteriálních kmenů byly významné rozdíly. U *Str. agalactiae* (CCM 6187) byla hodnota MIC ZnP 3,32krát nižší, než byla MIC ZnP u *Str. dysgalactiae* (DSM 20662). Mezi MIC GEN u *Str. agalactiae* (3,33 µg/ml) a u *Str. dysgalactiae* (0,94 µg/ml) byl také výrazný rozdíl (u *Str. agalactiae* MIC GEN byl až 3,54 vyšší násobek hodnoty *Str. dysgalactiae*).

Synergické účinky byly zaznamenány jak u *Str. agalactiae* (při koncentraci ZnP 0,0625– 0,0078125 µg/ml), tak u *Str. dysgalactiae* (při koncentraci ZnP 0,25– 0,0625 µg/ml). U zbylých kombinací ZnP a GEN u *Str. dysgalactiae* a u *Str. agalactiae* se jednalo o aditivní účinky. Výjimkou mohly být koncentrace ZnP u *Str. agalactiae* 0,00390625 µg/ml (FIC = 0,52) a u *Str. dysgalactiae* 0,03125 µg/ml (FIC = 0,51), kdy byly hodnoty FIC podobné hodnotám přiřazovaným synergickým interakcím. U obou testovaných bakteriálních druhů nebyly detekovány žádné antagonismy.

Tabulka 9: Konečný účinek kombinace pyrithion zinku s gentamicinem v reakci s kmeny *Streptococcus agalactiae*.

	MIC testovaných látek (µg/ml):		GEN + ZnP v koncentraci (µg/ml):													
			0,25		0,125		0,0625		0,03125		0,015625		0,0078125		0,00390625	
Kmen <i>Str.A.</i>	MIC GEN	MIC ZnP	MIC GEN	FIC	MIC GEN	FIC	MIC GEN	FIC	MIC GEN	FIC	MIC GEN	FIC	MIC GEN	FIC	MIC GEN	FIC
CCM 6187	3,33	0,25	0,06	1,02	0,27	0,58	0,35	0,36	0,42	0,25	0,67	0,26	0,67	0,23	1,67	0,52

Vysvětlivky: *Str.A.* – *Streptococcus agalactiae*

Tabulka 10: Konečný účinek kombinace pyrithion zinku s gentamicinem v reakci s kmeny *Streptococcus dysgalactiae*.

	MIC testovaných látek (µg/ml):		GEN + ZnP v koncentraci (µg/ml):													
			1		0,5		0,25		0,125		0,0625		0,03125		0,015625	
Kmen <i>Str.D.</i>	MIC GEN	MIC ZnP	MIC GEN	FIC	MIC GEN	FIC	MIC GEN	FIC	MIC GEN	FIC	MIC GEN	FIC	MIC GEN	FIC	MIC GEN	FIC
DSM 20662	0,94	0,83	0,02	1,22	0,02	0,62	0,08	0,39	0,09	0,24	0,14	0,22	0,70	0,51	0,77	0,58

Vysvětlivky: *Str.D.* – *Streptococcus dysgalactiae*

6 Diskuze

Mastitida je zánětlivé onemocnění mléčné žlázy, jež negativně ovlivňuje mléčnou produkci a welfare postižených zvířat (Kabelitz et al. 2021). Toto onemocnění je multi-etnologické, což může komplikovat jeho léčbu. Mastitida, pokud není včas залечена se může stát chronickou či může docházet k jejím častým recidivám (Kalińska et al. 2017). Kvůli tomu je zapotřebí rychlých, ekonomických, jednoduchých a zároveň účinných možností léčby (Kabelitz et al. 2021).

Léčba tohoto onemocnění spočívá v aplikaci antibiotik. V praxi je hojně využíváno aminoglykosidů (GEN), makrolidů (erythromycin, tilmokosin) a β -laktamových antibiotik (penicilin G, oxacilin, ampicilin) (Denamiel et al. 2005; Kabelitz et al. 2021). S antibiotickou terapií se však pojí vznik rezistentních bakteriálních kmenů, které onu léčbu komplikují. Výskyt a šíření bakterií rezistentních na antibiotickou terapii je celosvětový jev, který ohrožuje účinnost antimikrobiálních látek a zároveň snižuje možnost a rychlost léčby. Antibiotická rezistence je přičítána nadužívání a nedbalosti aplikace těchto léčiv (Ventola 2015). Z tohoto důvodu je třeba výzkumu a vývoje nových látek s antibakteriálními účinky. Dále je vhodné zvážit využití kombinačních účinků jednotlivých antibiotik, nebo i alternativních látek s antibakteriálním efektem (Amyes 2007). Mezi těmito alternativami mohou být zahrnuty očkování, rostlinné extrakty, enzymy, imunoterapie, organické kyseliny, antimikrobiální peptidy, bakteriofágy, probiotika, nanočástice a pyrithion zinek.

Cílem této diplomové práce bylo vytvořit literární rešerši ohledně antiseptických látek přírodního charakteru, jež by byly alternativou antibiotické léčbě. Tato práce se konkrétně zaměřila na potenciální antimikrobiální aktivitu ZnP ve vztahu k patogenním kmenům *Streptococcus* spp. Dalším cílem bylo stanovit MIC GEN a ZnP a stanovit i druhy interakcí kombinace těchto látek pomocí mikrodiluční-šachovnicové metody. Hypotéza byla ta, že ZnP bude v kombinaci s GEN vykazovat některý z typů interakcí (synergismus/ antagonismus/aditivní účinek) v reakci s patogenními kmeny *Streptococcus* spp.

V rámci předložené diplomové práce byly zjištěny vyšší hodnoty MIC ZnP vůči *Str. dysgalactiae* (0,83 $\mu\text{g/ml}$) ve srovnání se *Str. agalactiae* (0,25 $\mu\text{g/ml}$). Co se týče GEN, hodnoty MIC byly u *Str. agalactiae* vyšší (3,33 $\mu\text{g/ml}$) než u *Str. dysgalactiae* (0,94 $\mu\text{g/ml}$). To může být způsobeno vyšší mírou rezistence *Str. agalactiae* vůči GEN (44,43 %) než je míra rezistence *Str. dysgalactiae* vůči stejné látce (4,87 %) (Oliver & Murinda 2012; Martins et al. 2016).

Oproti dalším zástupcům Grampozitivních koků, byly v této diplomové práci detekovány daleko nižší hodnoty MIC ZnP. U *Str. dysgalactiae* byla hodnota MIC 0,83 $\mu\text{g/ml}$ a u *Str. agalactiae* 0,25 $\mu\text{g/ml}$. Blanchard et al. (2016) ve své studii získal mnohem vyšší hodnoty MIC u *Enterococcus faecium* (MIC = 2 $\mu\text{g/ml}$) či *Enterococcus faecalis* (MIC = 2 $\mu\text{g/ml}$). Nízké MIC ZnP u *Str. agalactiae* a *Str. dysgalactiae* poukazuje na citlivost těchto kmenů na tuto látku. ZnP může tedy být přínosným při léčbě mastitidy zapříčiněnou těmito druhy.

I když neexistují přímé důkazy použití ZnP v praxi při léčbě mastitidy, byla zjištěna jeho antimikrobiální činnost vůči mikroorganismům jako je *S. aureus*, *E. coli*

a *Pseudomonas aeruginosa*, jež toto onemocnění mohou způsobovat (Guthery et al. 2005; Park et al. 2018). Ve studii z roku 2016 (Blanchard et al.) byla rovněž zjištěna antimikrobiální aktivita ZnP k patogenům mastitidy jako je *E. coli* (MIC = 1 µg/ml), *S. aureus* (MIC = 1 µg/ml), *Klebsiella pneumoniae* (MIC = 2 µg/ml), *Pseudomonas aeruginosa* (MIC = 16 µg/ml), *Enterococcus faecium* (MIC = 2 µg/ml), *Enterococcus faecalis* (MIC = 2 µg/ml) a *Enterobacter cloacae* (MIC = 4 µg/ml). Z této studie byla nejvíce vyzdvížena antimikrobiální aktivita ZnP vůči *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *E. faecium* a *E. faecalis*. Je pozitivní i to, že ZnP inhiboval růst biofilm tvořícího *S. aureus*, jež je často velmi odolný vůči antimikrobiálním přípravkům.

Studie z roku 2015 (Monte-Serrano et al.) sledovala antimikrobiální aktivitu akrylového nátěru BactiBlock® 101 R4.47 (Paterna, Španělsko) obsahující 0,25 % ZnP a silikátového aditiva na bázi stříbra (obsah stříbra byl $1,91 \pm 0,03$ %). Kombinace těchto látek vykazovala antimikrobiální aktivitu u několika bakteriálních druhů: *Staphylococcus aureus* (MIC = 3 µg/ml), *Staphylococcus aureus* rezistentní na meticilin (MIC = 100 µg/ml), *Enterococcus faecium* rezistentní na vankomycin (MIC = 100 µg/ml), *Klebsiella pneumoniae* (MIC = 15 µg/ml), *Escherichia coli* (MIC = 100 µg/ml), *Pseudomonas aeruginosa* (MIC = 300 µg/ml) a *Aspergillus niger* (MIC = 3 µg/ml). Příznivý antimikrobiální účinek ZnP v kombinaci s látkou na základě stříbra podpořila i studie pod vedením Blanchard et al. (2016). Ten ve své studii poukázal na kombinaci sulfadiazanu stříbrného s ZnP, jejíž efekt byl vyšší než užití těchto látek jednotlivě. Podle této studie byla tato kombinace účinná i proti biofilm tvořícímu *S. aureus* (FIC = $0,52 \pm 0,02$) a u *P. aeruginosa* (FIC = $0,55 \pm 0,02$). Interakce antimikrobiálních látek mohou pomoci se snižováním mikrobiální rezistence, minimalizovat jejich vedlejší účinky, urychlovat léčbu či snižovat potřebné dávky léčiv (Greco et al. 1996; Caterina et al. 2013).

Interakce kombinace GEN a ZnP u *Str. agalactiae* a u *Str. dysgalactiae* detekované v této diplomové práci by mohly být vysvětleny tím, kde a jakým způsobem na bakteriální buňku působí (Aronson 2004; Caterina et al. 2013).

GEN baktericidně působí na buňku na základě inhibice její proteosyntézy. Tato látka se s vysokou afinitou váže v cytosolu na A-místo 16S ribozomální RNA 30S ribozomu. To zapříčiňuje bakteriální proteosyntézu náchylnou k chybovosti (Yoshizawa et al. 1998b; Bustos et al. 2018; Pancu et al. 2021).

ZnP se vyznačuje více mechanismy účinku. ZnP je znám svými baktericidními vlastnostmi založených na rozkladu fosfolipidů a následným poškozením CPM (Dinning et al. 1998). Ve studiích se rovněž hovoří o navýšení hladiny zinku v buňce vlivem působení ZnP, což indukuje akumulaci ROS, narušení elektronového transportního řetězce, snížení glykolýzy a redukci produkce ATP (Park et al. 2018). Dále může docházet k chelataci ZnP mědi a vzniku pyrrithionu mědi. Nadměrné množství mědi v mikrobiální buňce může inaktivovat enzym akonitázu, který je zapojen v mitochondriální produkci energie (Reeder et al. 2011; Mangion et al. 2021). Deplece ATP je rovněž v buňce způsobena přímou či nepřímou depolarizací CPM díky aktivitě ZnP a tím inhibicí protonových pump, které dodávají energii do buňky. Kvůli tomu dochází k omezení membránového transportu u mikroorganismů (Gupta et al. 2014; Park et al. 2018; Mangion et al. 2021).

Výše zmíněné testované látky působí na základě odlišných mechanismech účinku a na rozdílných místech bakteriální buňky (ZnP – CPM; GEN – cytosol a 30S ribozom). Těmito způsoby se jejich aktivita může doplňovat a mít za následek synergické interakce, jež byly nalezeny v této diplomové práci.

Jednotlivé cíle této práce byly v teoretické a praktické části naplněny. Byly zaznamenány synergické a aditivní účinky kombinace ZnP s GEN v reakci s patogenními kmeny *Str. agalactiae* a *Str. dysgalactiae*. Nebyly zaznamenány žádné antagonismy. Hypotéza této práce byla tudíž potvrzena.

Závažnost onemocnění bovinní mastitidy a rozšířená antibiotická rezistence vybízí k výzkumu v oblasti alternativních možností léčby. Další studium se naskýtá v podobě identifikace možných interakcí kombinace ZnP s dalšími antiseptickými látkami a popisu jeho mechanismu účinku i u dalších původců mastitidy. U této práce byl použit pouze jeden kmen od obou vybraných druhů streptokoků, tudíž by bylo patřičné testovat interakce kombinace GEN a ZnP i na jiných patogenních kmenech těchto bakteriálních druhů.

7 Závěr

Cílem této práce bylo vypracovat literární rešerši na téma působení antiseptických látek vůči patogenním kmenům *Streptococcus* spp. (*Str. agalactiae* CCM 6187; *Str. dysgalactiae* DSM 20662) zapříčínujících bovinní mastitidu. Dalšími cíli bylo určit minimální inhibiční aktivitu ZnP a posléze stanovit typy výsledných účinků kombinace ZnP a GEN. K tomu byla využita mikrodiluční-šachovnicová metoda. Předpoklad byl ten, že ZnP v kombinaci s GEN bude vykazovat určitý druh interakce (synergismus/antagonismus/aditivní účinek) v reakci s patogenními kmeny *Streptococcus* spp.

V této diplomové práci byla prokázána antimikrobiální aktivita ZnP a GEN ve vztahu k patogenním kmenům *Str. agalactiae* a *Str. dysgalactie*. Dále byly detekovány synergické a aditivní účinky kombinace ZnP a GEN. Synergie ZnP a GEN byla zaznamenána u *Str. agalactiae* při koncentracích ZnP 0,0625 µg/ml až 0,0078125 µg/ml a u *Str. dysgalactiae* při koncentracích ZnP od 0,25 µg/ml až 0,0625 µg/ml. U zbylých koncentrací ZnP se jednalo o indiferenci. Nebyly přítomné žádné antagonismy.

Jednotlivé cíle této práce byly dosaženy a hypotéza byla potvrzena. Kvůli přítomnosti synergických interakcí ZnP s GEN u obou bakteriálních kmenů a naléhavosti situace zapříčiněnou přítomností antibiotické rezistence, je vhodné pokračovat v dalším studiu interakcí ZnP s dalšími antiseptickými činiteli a popisu jeho mechanismu účinku i u dalších původců mastitidy.

8 Literatura

AHMADI M., H. D. SAEI, M. A. HESAMI, 2014. Antibacterial effect of silver nanoparticles along with protein synthesis-inhibiting antibiotics on *Staphylococcus aureus* isolated from cattle mastitis. *Biological Journal of Microorganism*. 2(8), 15–22. ISSN 2322-5173. Available at: <https://doaj.org/article/6c95b8f7c2ff4a1bb222032c1356cd4a>

AMYES, S. G. B., 2007. Enterococci and streptococci. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 29(3), 43–52. Available at: www.ischemo.org

ANANDA BASKARAN, S., G. W. KAZMER, L. HINCKLEY, S. M. ANDREW, K. VENKITANARAYANAN, 2009. Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogens in vitro. *Journal of Dairy Science*. 92(4), 1423–1429. ISSN 15253198. Available at: [doi:10.3168/jds.2008-1384](https://doi.org/10.3168/jds.2008-1384)

ANGELOPOULOU, A., A. K. WARDA, C. HILL, R. P. ROSS, 2019. Non-antibiotic microbial solutions for bovine mastitis—live biotherapeutics, bacteriophage, and phage lysins. *Critical Reviews in Microbiology*. 45(5–6), 564–580. ISSN 15497828. Available at: [doi:10.1080/1040841X.2019.1648381](https://doi.org/10.1080/1040841X.2019.1648381)

Anon., 2013. The antibiotic alarm. *Nature* 2013 495:7440. 495(7440), 141–141. ISSN 1476-4687. Available at: [doi:10.1038/495141a](https://doi.org/10.1038/495141a)

ARMISTEAD, B., E. OLER, K. A. WALDORF, L. RAJAGOPAL, 2019. The Double Life of Group B *Streptococcus*: Asymptomatic Colonizer and Potent Pathogen. *Journal of Molecular Biology*. 431(16), 2914–2931. ISSN 10898638. Available at: [doi:10.1016/j.jmb.2019.01.035](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.01.035)

ARONSON, J. K., 2004. Classifying drug interactions. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 58(4), 343–344. ISSN 03065251. Available at: [doi:10.1111/j.1365-2125.2004.02244.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2004.02244.x)

BAKER, C. N., C. THORNSBERRY, R. R. FACKLAM, 1981. Synergism, killing kinetics, and antimicrobial susceptibility of group A and B streptococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 19(5), 716. ISSN 00664804. Available at: [doi:10.1128/AAC.19.5.716](https://doi.org/10.1128/AAC.19.5.716)

BLANCHARD, C., L. BROOKS, K. EBSWORTH-MOJICA, L. DIDIONE, B. WUCHER, S. DEWHURST, D. KRYSAN, P. M. DUNMAN, R. A. F. WOZNIAK, 2016. Zinc Pyrithione Improves the Antibacterial Activity of Silver Sulfadiazine Ointment. *mSphere*. 1(5). ISSN 23795042. Available at: [doi:10.1128/msphere.00194-16](https://doi.org/10.1128/msphere.00194-16)

BOLTON, A., X. M. SONG, P. WILLSON, M. C. FONTAINE, A. A. POTTER, J. PEREZ-CASAL, 2004. Use of the surface proteins GapC and Mig of *Streptococcus dysgalactiae* as potential protective antigens against bovine mastitis. *Canadian journal of microbiology*. 50(6), 423–432. ISSN 0008-4166. Available at: [doi:10.1139/W04-016](https://doi.org/10.1139/W04-016)

BOUCHARD, D. S., B. SERIDAN, T. SARAoui, L. RAULT, P. GERMON, C. GONZALEZ-MORENO, F. M.E. NADER-MACIAS, D. BAUD, P. FRANÇOIS, V. CHUAT, F. CHAIN, P. LANGELLA, J. NICOLI, Y. LE LOIR, S. EVEN, 2015. Lactic Acid Bacteria Isolated from Bovine Mammary Microbiota: Potential Allies against Bovine Mastitis. *PloS one*. 10(12). ISSN 1932-6203. Available at: [doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0144831](https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0144831)

BUSHRA, R., N. ASLAM, 2010. An Overview of Clinical Pharmacology of Ibuprofen. *Oman Medical Journal*. 25(3), 155. ISSN 20705204. Available at: doi:10.5001/OMJ.2010.49

BUSTOS, P. S., R. DEZA-PONZIO, P. L. PÁEZ, J. L. CABRERA, M. B. VIRGOLINI, M. G. ORTEGA, 2018. Flavonoids as protective agents against oxidative stress induced by gentamicin in systemic circulation. Potent protective activity and microbial synergism of luteolin. *Food and Chemical Toxicology*. 118, 294–302. ISSN 18736351. Available at: doi:10.1016/j.fct.2018.05.030

CATERINA, P., Di PAOLO ANTONELLO, G. CHIARA, C. CHIARA, L. GIACOMO, S. ANTONIO, De SARRO GIOVAMBATTISTA, G. LUCA, 2013. Pharmacokinetic drug-drug interaction and their implication in clinical management. *Journal of Research in Medical Sciences*.18(7), 601-10.

CLSI, 2013. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; CLSI Approved Standard M100-S23. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne

COCK, L. S., C. E. E. VALENCIA, E. M. J. OBANDO, R. GAONA, 2012. Effects of fermentation substrates and conservation methods on the viability and antimicrobial activity of *Weissella confusa* and its metabolites, *Journal of Biotechnology* 15(3), Available at: 10.2225/vol15-issue3-fulltext-9

CORONA, F., J. L. MARTINEZ, 2013. Phenotypic Resistance to Antibiotics. *Antibiotics*. 2(2), 237. ISSN 20796382. Available at: doi:10.3390/ANTIBIOTICS2020237

COS, P., A. J. VLIETINCK, D. vanden BERGHE, L. MAES, 2006. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro “proof-of-concept.” *Journal of Ethnopharmacology*. 106(3), 290–302. ISSN 03788741. Available at: doi:10.1016/j.jep.2006.04.003

CRAIG, W. A., 2011. Optimizing aminoglycoside use. *Critical care clinics*. 27(1), 107–121. *International Journal of Antimicrobial Agents*, ISSN 1557-8232. Available at: doi: 10.1016/J.CCC.2010.11.006

CUSHNIE T. P. T., LAMB A. J., 2011. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. 38(2), 99-107, Available at: doi: 0.1016/j.ijantimicag. 2011.02.014

DAVIS, B. D., 1987. Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. *Microbiological Reviews*. 51(3), 341. ISSN 01460749. Available at: doi:10.1128/mmbr.51.3. 341-350.1987

DAVIS, B. D., L. CHEN, P. C. TAI, 1986. Misread protein creates membrane channels: an essential step in the bactericidal action of aminoglycosides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 83(16), 6164–6168. ISSN 0027-8424. Available at: doi:10.1073/PNAS.83.16.6164

DENAMIEL, G, P. LLORENTE, M. CARABELLA, M. REBUELTO, E. GENTILINI, 2005. Anti-microbial Susceptibility of *Streptococcus* spp. Isolated from Bovine Mastitis in Argentina. *Journal of Veterinary medicine*. 52(3), 125–128. Available at: doi: 10.1111/j.1439-0450.2005.00830.x

DIAS, R. S., M. R. ELLER, V. S. DUARTE, Â L. PEREIRA, C. C. SILVA, H. C. MANTOVANI, L. L. OLIVEIRA, E. de A.M. SILVA, S. O. DE PAULA, 2013. Use of phages against antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis.

Journal of animal science. 91(8), 3930–3939. ISSN 1525-3163. Available at: doi:10.2527/JAS.2012-5884

DINNING, A. J., I. S. I. AL-ADHAM, P. AUSTIN, M. CHARLTON, P. J. COLLIER, 1998. Pyrithione biocide interactions with bacterial phospholipid head groups. *Journal of Applied Microbiology*. 85(1), 132–140. Available at: doi:10.1046/j.1365-2672.1998.00477.x.

DOERN, C. D., C. A. D. BURNHAM, 2010. It's Not Easy Being Green: the Viridans Group Streptococci, with a Focus on Pediatric Clinical Manifestations. *Journal of Clinical Microbiology*. 48(11), 3829. ISSN 00951137. Available at: doi:10.1128/JCM.01563-10

ERSKINE, R. J., R. D. WALKER, C. A. BOLIN, P. C. BARTLETT, D. G. WHITE, 2002. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. *Journal of Dairy Science*. 85(5), 1111–1118. ISSN 00220302. Available at: doi:10.3168/jds.S0022-0302(02)74172-6

ERSKINE, R. J., S. WAGNER, F. deGRAVES, 2003. Mastitis therapy and pharmacology. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*. 19(1), 109–38. Available at: doi: 10.1016/s0749-0720(02)00067-1

FAO/WHO, 2006. Report of joint FAO/WHO expert consultation on the health and nutritional properties of powdermilk with live lactic acid bacteria. Available at: <http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf>

FEDERMAN, C., C. MA, D. BISWAS, 2016. Major components of orange oil inhibit *Staphylococcus aureus* growth and biofilm formation, and alter its virulence factors. *Journal of medical microbiology*. 65(7), 688–695. ISSN 1473-5644. Available at: doi:10.1099/JMM.0.000286

FENTON, M., R. KEARY, O. MCAULIFFE, R. P. ROSS, J. O'MAHONY, A. COFFEY, 2013. Bacteriophage-Derived Peptidase CHAP(K) Eliminates and Prevents Staphylococcal Biofilms. *International journal of mikrobiology*. 2013. ISSN 1687-918X. Available at: doi:10.1155/2013/625341

FONSECA, A. P., F. T. ESTRELA, T. S. MORAES, L. J. CARNEIRO, J. K. BASTOS, R. A. DOS SANTOS, S. R. AMBRÓSIO, C. H.G. MARTINS, R. C. S. VENEZIANI, 2013. In Vitro Antimicrobial Activity of Plant-Derived Diterpenes against Bovine Mastitis Bacteria. *Molecules*. 18(7), 7865. ISSN 14203049. Available at: doi:10.3390/MOLECULES18077865

FRUTIS-MURILLO, M., M. A. SANDOVAL-CARRILLO, N. ALVA-MURILLO, A. OCHOA-ZARZOSA, J. E. LÓPEZ-MEZA, 2019. Immunomodulatory molecules regulate adhesin gene expression in *Staphylococcus aureus*: Effect on bacterial internalization into bovine mammary epithelial cells. *Microbial Pathogenesis*. 131, 15–21. ISSN 0882-4010. Available at: doi:10.1016/J.MICPATH.2019.03.030

GANIÈRE, J. P., L. DENUAULT, 2009. Synergistic interactions between cefalexin and kanamycin in Mueller-Hinton broth medium and in milk. *Journal of applied mikrobiology*. 107(1), 117–125. ISSN 1365-2672. Available at: doi: 10.1111/J.1365-2672.2009.04191.X

GIBSON, W. B., G. CALVIN, 1978. Percutaneous absorption of zinc pyridinethione in monkeys. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 43(3), 425–437. ISSN 0041-008X. Available at: doi:10.1016/S0041-008X(78)80002-7

GIBSON, W. T., W. S. HARDY, M. H. GROOM, 1985. The effect and mode of action of zinc pyrithione on cell growth. II in vivo studies. Available at: doi:10.1016/0278-6915(85)90227-3

GILL, S. R., M. POP, R. T. DEBOY, P. B. ECKBURG, Peter J. TURNBAUGH, B. S. SAMUEL, J. I. GORDON, D. A. RELMAN, C. M. FRASER-LIGGETT, K. E. NELSON, 2006. Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. *Science* (New York, N.Y.). 312(5778), 1355. ISSN 00368075. Available at: doi:10.1126/SCIENCE.1124234

GODOY-SANTOS, F., M. S. PINTO, A. A.T. BARBOSA, M. A.V.P. BRITO, H. C. MANTOVANI, 2019. Efficacy of a Ruminal Bacteriocin Against Pure and Mixed Cultures of Bovine Mastitis Pathogens. *Indian Journal of Microbiology*. 59(3), 304. ISSN 09737715. Available at: doi:10.1007/S12088-019-00799-W

GOMES, F., M. HENRIQUES, 2015. Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches. *Current Microbiology* 2015 72:4. 72(4), 377–382. ISSN 1432-0991. Available at: doi:10.1007/S00284-015-0958-8

GOMES, F., M. HENRIQUES, 2016. Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches. *Current Microbiology*. 72. Available at: doi:10.1007/s00284-015-0958-8

GRECO, W. R., H. FAESSEL, L. LEVASSEUR, 1996. The search for cytotoxic synergy between anticancer agents: a case of Dorothy and the ruby slippers? *Journal of the National Cancer Institute*. 88(11), 699–700. ISSN 0027-8874. Available at: doi:10.1093/JNCI/88.11.699

GUPTA, M., V. K. MAHAJAN, K. S. MEHTA, P. S. CHAUHAN, 2014. Zinc therapy in dermatology: A review. *Dermatology Research and Practice*. 2014. ISSN 16876113. Available at: doi:10.1155/2014/709152

GUTHERY, E., L. A. SEAL, E. L. ANDERSON, 2005. Zinc pyrithione in alcohol-based products for skin antisepsis: Persistence of antimicrobial effects. *American Journal of Infection Control*. 33(1), 15–22. ISSN 01966553. Available at: doi:10.1016/j.ajic.2004.07.012

HAENNI, M., A. LUPO, J.-Y. MADEC, 2018. Antimicrobial Resistance in *Streptococcus* spp. *Microbiology Spectrum*. 6(2). ISSN 2165-0497. Available at: doi:10.1128/microbiolspec.arba-0008-2017

HARDIE, J. M., R. A. WHILEY, 1997. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*. 83, 1–11. Available at: doi:10.1046/j.1365-2672.83.s1.1.x

HASE, P., S. DIGRASKAR, K. RAVIKANTH, M. DANDALE, S. MAINI, 2013. Management of subclinical mastitis with mastilep gel and herbal spray (AV/AMS/15). *International Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2(4), 64–067.

HILL, C., F. GUARNER, G. REID, G. R. GIBSON, D. J. MERENSTEIN, B. POT, L. MORELLI, R. B. CANANI, H. J. FLINT, S. SALMINEN, P. C. CALDER, M. ELLEN SANDERS, 2014. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*. 11(8), 506–514. ISSN 1759-5053. Available at: doi:10.1038/NRGASTRO.2014.66

HILLERTON, J. E., E. A. BERRY, 2003. The management and treatment of environmental streptococcal mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal*

Practice. 19(1), 157–169. ISSN 0749-0720. Available at: doi:10.1016/S0749-0720(02)00069-5

HOGAN, J. S., K. L. SMITH, 2003. Environmental Streptococcal Mastitis: Facts, Fables, and Fallacies. Western Dairy Management Conference. 162-170.

CHANDLER, C. J, I. H. SEGEL, 1978. Mechanism of the Antimicrobial Action of Pyrithione: Effects on Membrane Transport, ATP Levels, and Protein Synthesis. Antimicrobial agents and chemotherapy. 60–68. Available at: doi:10.1128/aac.14.1.60

CHEN, C., Y. CHEN, P. WU, B. CHEN, 2014. Update on new medicinal applications of gentamicin: Evidence-based review. Journal of the Formosan Medical Association. 113(2), 72–82. ISSN 09296646. Available at: doi:10.1016/j.jfma.2013.10.002

CHENG, W. N., S. G. HAN, 2020. Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments — A review. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 33(11), 1699–1713. ISSN 19765517. Available at: doi:10.5713/ajas.20.0156

CHENG, W. N., C. H. JEONG, H. G. SEO, S. G. HAN, 2019. Moringa Extract Attenuates Inflammatory Responses and Increases Gene Expression of Casein in Bovine Mammary Epithelial Cells. Animals: an open access journal from MDPI. 9(7). ISSN 2076-2615. Available at: doi:10.3390/ANI9070391

IMOKAWA, G., K. OKAMOTO, 1983. The effect of zinc pyrithione on human skin cells in vitro. j. Soc. Cosmet. Chem. 34, 1–11.

JOUANY, J. P., D. P. MORGAVI, 2007. Use of “natural” products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. Animal. 1(10), 1443–1466. ISSN 17517311. Available at: doi:10.1017/S1751731107000742

KABARA, J. J., D. M. SWIECZKOWSKI, A. J. CONLEY, J. P. TRUANT, 1972. Fatty Acids and Derivatives as Antimicrobial Agents. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2(1), 23. ISSN 00664804. Available at: doi:10.1128/AAC.2.1.23

KABELITZ, T., E. AUBRY, K. VAN VORST, T. AMON, M. FULDE, 2021. The role of streptococcus spp. In bovine mastitis. Microorganisms. 9(7). ISSN 20762607. Available at: doi:10.3390/microorganisms9071497

KALIŃSKA, A., M. GOŁĘBIEWSKI, A. WÓJCIK, 2017. Mastitis pathogens in dairy cattle-a review. World scientific news. 89, 22–31. ISSN 2392-2192. Available at: www.worldscientificnews.com

KLINGSBERG, E., G. R. (George Richard) NEWKOME, 1964. Pyridine and its derivatives. New York: Wiley & Sons Ltd. ISBN 9780471050728.

KOTRA, L. P., J. HADDAD, S. MOBASHERY, 2000. Aminoglycosides: Perspectives on Mechanisms of Action and Resistance and Strategies to Counter Resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 44(12), 3249. ISSN 00664804. Available at: doi:10.1128/AAC.44.12.3249-3256.2000

KRACH-HANSEN, U., V. T. G. CHUANG, M. OTAGIRI, 2002. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. Biological & pharmaceutical bulletin. 25(6), 695–704 [accessed. 2022-03-10]. ISSN 0918-6158. Available at: doi:10.1248/BPB.25.695

KRAUSE, K. M., A. W. SERIO, T. R. KANE, L. E. CONNOLLY, 2016. Aminoglycosides: An overview. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 6(6). ISSN 21571422. Available at: doi:10.1101/cshperspect.a027029

KREJČÍ, E., 2020. Vzdávající rezistence k antibiotikům a racionální antibiotická terapie. *Medicína pro praxi*. 17(1), 8–12.

LAMORE, S. D., C. M. CABELLO, G. T. WONDRAK, 2010. The topical antimicrobial zinc pyrithione is a heat shock response inducer that causes DNA damage and PARP-dependent energy crisis in human skin cells. *Cell Stress and Chaperones*. 15(3), 309–322. ISSN 13558145. Available at: doi:10.1007/s12192-009-0145-6

LAMORE, S. D., G. T. WONDRAK, 2011. Zinc pyrithione impairs zinc homeostasis and upregulates stress response gene expression in reconstructed human epidermis. *BioMetals*. 24(5), 875–890. ISSN 09660844. Available at: doi:10.1007/s10534-011-9441-6

LANGER, M. N., S. BLODKAMP, M. BAYERBACH, A. T. FESSLER, N. DE BUHR, T. GUTSMANN, L. KREIENBROCK, S. SCHWARZ, M. VON KÖCKRITZ-BLICKWEDE, 2017. Testing cathelicidin susceptibility of bacterial mastitis isolates: Technical challenges and data output for clinical isolates. *Veterinary microbiology*. 210, 107–115. ISSN 1873-2542. Available at: doi:10.1016/J.VETMIC.2017.08.022

LANNES-COSTA, P. S., J. S.S. DE OLIVEIRA, G. DA SILVA SANTOS, P. E. NAGAO, 2021. A current review of pathogenicity determinants of *Streptococcus* sp. *Journal of Applied Microbiology*. 131(4), 1600–1620. ISSN 13652672. Available at: doi:10.1111/jam.15090

LARSEN, J. W., J. L. SEVER, 2008. Group B *Streptococcus* and pregnancy: a review. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 198(4), 440–450. ISSN 00029378. Available at: doi:10.1016/j.ajog.2007.11.030

LOPES, T. S., P. S. FONTOURA, A. OLIVEIRA, F. A. RIZZO, S. SILVEIRA, A. F. STRECK, 2020. Use of plant extracts and essential oils in the control of bovine mastitis. *Research in veterinary science*. 131, 186–193. ISSN 15322661. Available at: doi:10.1016/j.rvsc.2020.04.025

MAGNET, S., J. S. BLANCHARD, 2005. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chemical reviews*. 105(2), 477–497. ISSN 0009-2665. Available at: doi:10.1021/CR0301088

MANGION, S. E., A. M. HOLMES, M. S. ROBERTS, 2021. Targeted delivery of zinc pyrithione to skin epithelia. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(18). ISSN 14220067. Available at: doi:10.3390/ijms22189730

MARTINS, T., A. F. ROSA, L. CASTELANI, M. S. DE MIRANDA, J. R.P. ARCARO, C. R. POZZI, 2016. Intramammary treatment with gentamicin in lactating cows with clinical and subclinical mastitis. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*. 36(4), 283–289. ISSN 16785150. Available at: doi:10.1590/S0100-736X2016000400006

MONTE-SERRANO, M., P. FERNANDEZ-SAIZ, R. M. ORTÍ-LUCAS, 2015. Effective Antimicrobial Coatings Containing Silver-Based Nanoclays and Zinc Pyrithione. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*. 07(06), 398–403. Available at: doi:10.4172/1948-5948.1000245

MUSHTAQ, S., A. M. SHAH, A. SHAH, S. A. LONE, A. HUSSAIN, Q. P. HASSAN, M. N. ALI, 2018. Bovine mastitis: An appraisal of its alternative herbal cure. *Microbial Pathogenesis*. 114, 357–361. ISSN 10961208. Available at: doi:10.1016/j.micpath.2017.12.024

NAIR, M. K.M., J. JOY, P. VASUDEVAN, L. HINCKLEY, T. A. HOAGLAND, K. S. VENKITANARAYANAN, 2005. Antibacterial effect of caprylic acid and monocaprylin on major bacterial mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science*. 88(10), 3488–3495. ISSN 00220302. Available at: doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)73033-2

NISHA, R. D., 2018. Evaluation of Analgesic And Anti-inflammatory Activity of Herbal Formulation Used for Mastitis in Animals. *International Journal of Applied Science and Engineering*. 6(1), 37–48. ISSN 23210745. Available at: doi:10.30954/2322-0465.1.2018.4

ODDS, F. C., 2003. Editorial Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 52(1), 1. Available at: doi:10.1093/jac/dkg301

O'HALLORAN, F., C. BEECHER, V. CHAURIN, T. SWEENEY, L. GIBLIN, 2016. Lactoferrin affects the adherence and invasion of *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *dysgalactiae* in mammary epithelial cells. *Journal of Dairy Science*. 99(6), 4619–4628. ISSN 15253198. Available at: doi:10.3168/jds.2015-10465

OLIVER, S. P., S. E. MURINDA, 2012. Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*. 28(2), 165–185. ISSN 07490720. Available at: doi:10.1016/j.cvfa.2012.03.005

PANCU, D. F., A. SCURTU, I. G. MACASOI, D. MARTI, M. MIOC, C. SOICA, D. CORICOVAC, D. HORHAT, M. POENARU, C. DEHELEAN, 2021. Antibiotics: Conventional therapy and natural compounds with antibacterial activity-a pharmacotoxicological screening. *Antibiotics*. 10(4), 401. ISSN 20796382. Available at: doi:10.3390/antibiotics10040401

PANSY, F. E., H. STANDER, W. L. KOERBER, R. DONOVICK, 1953. In vitro studies with 1-hydroxy-2(1H) pyridinethione. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.). 82(1), 122–124. ISSN 0037-9727. Available at: doi:10.3181/00379727-82-20041

PARISIEN, A., B. ALLAIN, J. ZHANG, R. MANDEVILLE, C. Q. LAN, 2008. Novel alternatives to antibiotics: Bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *Journal of Applied Microbiology*. 104(1), 1–13. ISSN 13645072. Available at: doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03498.x

PARK, M., Y. J. CHO, Y. W. LEE, W. H. JUNG, 2018. Understanding the Mechanism of Action of the Anti-Dandruff Agent Zinc Pyrithione against *Malassezia restricta*. *Scientific Reports*. 8(1). ISSN 20452322. Available at: doi:10.1038/s41598-018-30588-2

PELLEGRINO, M., N. BERARDO, J. GIRAUDDO, M. E.F. NADER-MACÍAS, C. BOGNI, 2017. Bovine mastitis prevention: humoral and cellular response of dairy cows inoculated with lactic acid bacteria at the dry-off period. <https://doi.org/10.3920/BM2016.0194>. 8(4), 589–596. ISSN 18762891. Available at: doi:10.3920/BM2016.0194

PELLEGRINO, M. S., I. D. FROLA, B. NATANAEL, D. GOBELLI, M. E.F. NADER-MACIAS, C. I. BOGNI, 2018. In Vitro Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Bovine Milk as Potential Probiotic Strains to Prevent Bovine Mastitis.

Probiotics and Antimicrobial Proteins 2018 11:1. 11(1), 74–84. ISSN 1867-1314. Available at: doi:10.1007/S12602-017-9383-6

PEREIRA, U. P., G. F. MIAN, I. C.M. OLIVEIRA, L. C. BENCHETRIT, G. M. COSTA, H. C.P. FIGUEIREDO, 2010. Genotyping of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from fish, human and cattle and their virulence potential in Nile tilapia. *Veterinary Microbiology*. 140(1–2), 186–192. ISSN 03781135. Available at: doi:10.1016/j.vetmic.2009.07.025

PETERS, J., J. PRICE, M. LLEWELYN, 2017. Staphylococcal and streptococcal infections. *Medicine* 45(12) Available at: doi: 0.1016/j.mpmed.2017.09.010

PETITCLERC, D., K. LAUZON, A. COCHU, C. STER, M. S. DIARRA, P. LACASSE, 2007. Efficacy of a lactoferrin-penicillin combination to treat {beta}-lactam-resistant *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of dairy science*. 90(6), 2778–2787. ISSN 1525-3198. Available at: doi:10.3168/JDS.2006-598

PIEPERS, S., S. DE VliegHER, 2018. Alternative approach to mastitis management – How to prevent and control mastitis without antibiotics? *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 55(3). ISSN 16784456. Available at: doi:10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2018.137149

PINEDO, P., H. KARREMAN, H. BOTHE, J. VELEZ, C. RISCO, 2013. Efficacy of a botanical preparation for the intramammary treatment of clinical mastitis on an organic dairy farm. *CVJ*. 54(5), 479-484.

POLYCARPO, G. v., I. ANDRETTA, M. KIPPER, V. C. CRUZ-POLYCARPO, J. C. DADALT, P. H.M. RODRIGUES, R. ALBUQUERQUE, 2017. Meta-analytic study of organic acids as an alternative performance-enhancing feed additive to antibiotics for broiler chickens. *Poultry Science*. 96(10), 3645–3653. ISSN 0032-5791. Available at: doi:10.3382/PS/PEX178

PORTER, J., J. ANDERSON, L. CARTER, E. DONJACOUR, M. PAROS, 2016. In vitro evaluation of a novel bacteriophage cocktail as a preventative for bovine coliform mastitis. *Journal of dairy science*. 99(3), 2053–2062. ISSN 1525-3198. Available at: doi:10.3168/JDS.2015-9748

SALIH R. M., R., H. H. GIBREEL, 2019. Gentamicin is the best antibiotic in treatment all types of bovine mastitis caused by bacteria. *Agriculture and Forestry Journal*. 3(1), 46–49. ISSN 2602-5795. Available at: <http://ojs.univ-tlemcen.dz/index.php/AFJ/>

RAINARD, P., F. B. GILBERT, P. GERMON, G. FOUCRAS, 2021. Invited review: A critical appraisal of mastitis vaccines for dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 104(10), 10427–10448. ISSN 15253198. Available at: doi:10.3168/jds.2021-20434

RAJALA-SCHULTZ, P. J., Y. T. GRÖHN, C. E. MCCULLOCH, 1999. Effects of milk fever, ketosis, and lameness on milk yield in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 82(2), 288–294. ISSN 00220302. Available at: doi:10.3168/jds.S0022-0302(99)75235-5

RAJAMANICKAM, K., J. YANG, S. B. CHIDAMBARAM, M. K. SAKHARKAR, 2020. Enhancing drug efficacy against mastitis pathogens—an in vitro pilot study in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Animals*. 10(11), 1–15. ISSN 20762615. Available at: doi:10.3390/ANI10112117

REEDER, N. L., J. KAPLAN, J. XU, R. S. YOUNGQUIST, J. WALLACE, P. HU, K. D. JUHLIN, J. R. SCHWARTZ, R. A. GRANT, A. FIENO, S. NEMETH, T. REICHLING, J.

P. TIESMAN, T. MILLS, M. STEINKE, S. L. WANG, C. W. SAUNDERS, 2011. Zinc pyrithione inhibits yeast growth through copper influx and inactivation of iron-sulfur proteins. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 55(12), 5753–5760. ISSN 1098-6596. Available at: doi:10.1128/AAC.00724-11

ROBERSON J.R., 2015. The Veterinary clinics of North America. Food animal practice, 28(2), 271–288. Available at: doi: 10.1016/j.cvfa.2012.03.011

ROLLIN, E., K. C. DHUYVETTER, M. W. OVERTON, 2015. The cost of clinical mastitis in the first 30 days of lactation: An economic modeling tool. *Preventive veterinary medicine*. 122(3), 257–264. ISSN 1873-1716. Available at: doi:10.1016/J.PREVETMED.2015.11.006

RUPPEN, C., L. DECOSTERD, P. SENDI, 2017. Is gentamicin necessary in the antimicrobial treatment for group B streptococcal infections in the elderly? An in vitro study with human blood products. *Infectious Diseases*. 49(3), 185–192. ISSN 23744235. Available at: doi:10.1080/23744235.2016.1244612

SADEGHIAN G., ZIAEI H., NILFOROUSHZADEH M. A., 2011. Treatment of localized psoriasis with a topical formulation of zinc pyrithione. *Acta Dermatoven APA*. 20(4).

SCIENTIFIC COMMITTEE ON COMSUMER SAFETY, 2020. Opinion on Zinc Pyrithione (ZPT) (CAS No 13463-41-7) - Submission III. Available at: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/experts/declarations/sccs_en.htm

SEEDHER N., AGARWAL P., 2010. Effect of metal ions on some pharmacologically relevant interactions involving fluoroquinolone antibiotics. 25(1-4), 17-24. Available at: doi: 10.1515/DMDI.2010.003

SERNA-COCK, L., O. V. PABÓN-RODRÍGUEZ, 2016. Development of a Teat Bio-sealant and Evaluation of its Technological and Functional Properties. *Probiotics and antimicrobial proteins*. 8(2), 111–119. ISSN 1867-1314. Available at: doi:10.1007/S12602-016-9210-5

SEROUSSI, E., S. E. BLUM, O. KRIFUCKS, Y. LAVON, G. LEITNER, 2018. Application of pancreatic phospholipase A2 for treatment of bovine mastitis. *PloS one*. 13(8) [accessed. 2022-02-06]. ISSN 1932-6203. Available at: doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0203132

SHARUN, K. K. DHAMA, R. TIWARI, M. B. GUGJOO, M. IQBAL YATOO, S. K. PATEL, M. PATHAK, K. KARTHIK, S. K. KHURANA, R. SINGH, B. PUVVALA, AMARPAL, R. SINGH, K. P. SINGH, W. CHAICUMPA, 2021. Advances in therapeutic and managemental approaches of bovine mastitis: a comprehensive review. *Veterinary Quarterly*. 41(1), 107–136. ISSN 18755941. Available at: doi:10.1080/01652176.2021.1882713

SHAW, E., J. BERNSTEIN, K. LOSEE, W. A. LOTT, 1950. Analogs of Aspergillilic Acid. IV. Substituted 2-Bromopyridine-N-oxides and Their Conversion to Cyclic Thiohydroxamic Acids1. *Journal of the American Chemical Society*. 72(10), 4362–4364. ISSN 15205126. Available at: doi:10.1021/JA01166A008

STONEHAM, S., J. PETERS, J. PRICE, 2021. Staphylococcal and streptococcal infections. *Medicine*. 49(12), 731–738. Available at: doi:10.1016/j.mpmed.2021.09.001

SWINGLE, H. M., Richard L. BUCCIARELLI, E. M. AYOUB, 1985. Synergy Between Penicillins and Low Concentrations of Gentamicin in the Killing of Group B

Streptococci. *The Journal of Infectious Diseases*. 152(3), 515–520. ISSN 0022-1899. Available at: doi:10.1093/INFDIS/152.3.515

TALLARIDA R., 2001. Drug synergism: its detection and applications. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 298(3), 865–72.

TANAKA, D., J. ISOBE, M. WATAHIKI, Y. NAGAI, C. KATSUKAWA, R. KAWAHARA, M. ENDOH, R. OKUNO, N. KUMAGAI, M. MATSUMOTO, Y. MORIKAWA, T. IKEBE, H. WATANABE, S. SAITO, K. OOTANI, M. OGURO, J. FUJISAKI, K. SUGAMA, K. HIRASAWA, J. ISOBE, D. TANAKA, M. MATSUMOTO, M. SAKAKI, Y. KASAMA, H. TANAKA, C. SUNAHARA, T. YASUOKA, T. SHIMIZI, S. MOROISHI, Y. ABE, K. OGATA, J. KUDAKA, T. IKEBE, H. WATANABE, M. ENDOH, R. OKUNO, R. SUZUKI, C. KATSUKAWA, R. KAWAHARA, M. TOMITA, 2008. Genetic Features of Clinical Isolates of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* Possessing Lancefield's Group A Antigen. *Journal of Clinical Microbiology*. 46(4), 1526. ISSN 00951137. Available at: doi:10.1128/JCM.02188-07

TOROK, M. E., N. P.J. DAY, 2009. Staphylococcal and streptococcal infections. *Medicine*. 37(12), 629–634. ISSN 13573039. Available at: doi:10.1016/j.mpmed.2009.09.009

VENTOLA, C. L., 2015. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *Pharmacy and Therapeutics*. 40(4), 277. ISSN 1052-1372. Available at: /pmc/articles/PMC4378521/

WACHINO, J. I., Y. ARAKAWA, 2012. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* . 15(3), 133–148 [accessed. 2022-03-02]. ISSN 1532-2084. Available at: doi:10.1016/J.DRUP.2012.05.001

WEDIG, J. H., H. I. MAIBACH, 1981. Percutaneous penetration of dipyrithione in man: effect of skin color (race). *Journal of the American Academy of Dermatology*. 5(4), 433–438. ISSN 0190-9622. Available at: doi:10.1016/S0190-9622(81)70105-1

WHO, 2015. Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241509763>

WHO, 2021. Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240027336>

WYDER, A. B., R. BOSS, J. NASKOVA, T. KAUFMANN, A. STEINER and H. U. GRABER, 2011. *Streptococcus* spp. and related bacteria: Their identification and their pathogenic potential for chronic mastitis – A molecular approach. *Research in Veterinary Science*. 91(3), 349–357. ISSN 00345288. Available at: doi:10.1016/j.rvsc.2010.09.006

YASOKAWA, D., S. MURATA, Y. IWAHASHI, E. KITAGAWA, K. KISHI, Y. OKUMURA and H. IWAHASHI, 2010. DNA microarray analysis suggests that zinc pyrithione causes iron starvation to the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bioscience and bioengineering*. 109(5), 479–486 [accessed. 2022-03-08]. ISSN 1347-4421. Available at: doi:10.1016/J.JBIOOSC.2009.10.025

YOSHIZAWA, S., D. FOURMY, J. D. PUGLISI, 1998a. Structural origins of gentamicin antibiotic action. *The EMBO Journal*. 17(22), 6437–6448.

YOSHIZAWA, S., D. FOURMY, J. D. PUGLISI, 1998b. Structural origins of gentamicin antibiotic action. *The EMBO journal*. 17(22), 6437–6448. ISSN 0261-4189. Available at: doi:10.1093/EMBOJ/17.22.6437

YOUNG-SPEIRS, M., D. DROUIN, P. A. CAVALCANTE, H. W. BARKEMA, E. R. COBO, 2018. Host defense cathelicidins in cattle: types, production, bioactive functions and potential therapeutic and diagnostic applications. *International journal of antimicrobial agents*. 51(6), 813–821. ISSN 1872-7913. Available at: doi:10.1016/J.IJANTIMICAG.2018.02.006

YOUNUS, M., Tanveer AHMAD, A. SHARIF, M. QAMAR BILAL, M. NADEEM, K. ASHFAQ, 2018. Comparative therapeutic efficacy of homeopathic complex, herbal extract and antibiotic in the treatment of subclinical mastitis in dairy buffaloes. *Buffalo Bulletin*. 37(2), 221–234. ISSN 2539-5696.

YU, J., Y. REN, X. X. XI, W. HUANG, H. ZHANG, 2017. A novel lactobacilli-based teat disinfectant for improving bacterial communities in the milks of cow teats with subclinical mastitis. *Frontiers in Microbiology*. 8, 1782. ISSN 1664302X. Available at: doi: 10.3389/FMICB.2017.01782/BIBTEX

YU, L., Z. FAN, J. MA, C. TONG, B. SONG, Z. ZHU, Y. CUI, 2014. Cross-protective effect of a novel multi-antigen-chimeric vaccine against *Streptococcus* and *Staphylococcus aureus* infection in mice. *Journal of medical microbiology*. 63(Pt 12), 1732–1740. ISSN 1473-5644. Available at: doi:10.1099/JMM.0.073593-0

ZACCHINO, S. A., E. BUTASSI, E. CORDISCO, L. A. SVETAZ, 2017. Hybrid combinations containing natural products and antimicrobial drugs that interfere with bacterial and fungal biofilms. *Phytomedicine*. 37, 14–26. ISSN 1618095X. Available at: doi:10.1016/j.phymed.2017.10.021