

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra chovu hospodářských zvířat**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Možnosti stanovení a eradikace mastitid v chovu dojeného  
skotu**

**Bakalářská práce**

**Vodová Josefína**

**Chov hospodářských zvířat**

**Ing. Jaromír Ducháček, Ph.D.**

© 2024 ČZU v Praze



## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Možnosti stanovení a eradikace mastitid v chovu dojeného skotu" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské 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 bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26. dubna 2024

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala velmi ochotnému panu Ing. Jaromíru Ducháčkovi, Ph.D. za podporu a odbornou pomoc při zpracování bakalářské práce. Také bych ráda poděkovala celé mé rodině za lásku a vždy velkou podporu po dobu mého studia.

# Metody stanovení a eradikace mastitid v chovu dojeného skotu

## Souhrn

Bakalářská práce se zabývá mastitidou (zánětem mléčné žlázy), způsoby léčby a prevencí tohoto onemocnění.

Mastitida skotu, která je v chovech dojnic rozšířeným problémem, vzniká v důsledku nesčetných příčin primárně vyvolaných mikrobiálními původci, ale významně ovlivněných genetickými predispozicemi, podmínkami prostředí a způsoby chovu. Genetická výbava dojnic hraje zásadní roli v jejich náchylnosti k mastitidě, přičemž pozornost je soustředěna na výběr zvířat odolných vůči infekci prostřednictvím identifikace genů a markerů rezistence. Faktory prostředí, jako jsou nevhodné podmínky ustájení, špatné větrání a vysoká koncentrace zvířat, přispívají k šíření patogenů způsobujících mastitidu. Nedostatky ve výživě prohlubují imunosupresi během laktace, což dále zvyšuje náchylnost k infekcím. Další problém představují teplotní výkyvy způsobené změnou klimatu, neboť vyšší teploty podporují růst bakterií způsobujících mastitidu. Pro snížení výskytu a dopadu mastitid ve stádech dojnic jsou zásadní strategická opatření, včetně zlepšení hygieny na farmách, protokolů biologické bezpečnosti a genetické selekce.

Včasně odhalení zánětu mléčné žlázy vzhledem k jeho různým příčinám je stále velmi obtížné. Šlechtění na vyšší produkci mléka zvyšuje riziko mastitidy, přičemž ovlivňuje kvalitu mléka, užitkovost krav a používání antimikrobiálních látek. Sledování počtu somatických buněk je zásadní stejně jako snížení používání antibiotik v boji proti rostoucímu problému antimikrobiální rezistence. Technologie biosenzorů nabízejí automatickou detekci mastitidy během dojení, zatímco infračervená termografie pomáhá včasnému odhalení zánětu a podporuje hodnocení zdraví vemene. Celkově jsou komplexní strategie prevence, včasného odhalení a kontroly nezbytné pro udržení kvality mléka, dobrých životních podmínek dojných krav a ekonomické rentability.

Patogeny *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis* a *Staphylococcus aureus* přispívají ke složitému charakteru mastitid, zároveň účinnost kontrolních opatření určuje prostředí a zdroj nákazy. Klinické a subklinické formy představují diagnostický problém, přičemž subklinické případy jsou častější a obtížněji zjištělné. K detekci napomáhají různé testy, včetně NK testu (California mastitis test CMT), WMT (Wisconsin Mastitis test) a počítání somatických buněk v 1 mililitru mléka (SCC), ačkoli novější metody, jako je izotermická amplifikace zprostředkovaná smyčkou LAMP (amplifikace DNA v izotermických podmínkách s vyšší specifitou a rychlostí než polymerase chain reaction zkratky PCR), jsou slibné pro rychlou diagnostiku na farmách. Navzdory problémům pokrok v diagnostických technologiích dává naději na zlepšení řízení a kontroly mastitid v chovech dojnic.

Neantibiotické strategie, jako jsou probiotika, bakteriociny a rostlinné extrakty, vykazují účinnost v boji proti původcům mastitidy. Bakteriociny, například nisin, vykazují antimikrobiální aktivitu, zatímco rostlinné extrakty a esenciální oleje mají antibakteriální a protizánětlivé vlastnosti. Bakteriofágy se zaměřují na specifické bakteriální kmeny, kdežto

anorganické nanočástice vykazují antimikrobiální účinky. Mezenchymální kmenové buňky a extracelulární vezikuly přispívají k regeneraci tkání, snižují počet somatických buněk a míru zánětu. Další přístupy zahrnují látky uvolňující oxid dusnatý, vakcíny a terapii protilátkami, které dohromady nabízejí mnohostranný přístup k léčbě a prevenci mastitidy.

Etno-veterinární přípravky, jako jsou bylinné léky, nabývají na popularitě pro své antibakteriální a antivirové vlastnosti. Imunoterapie prokázala účinnost v boji proti mastitidě a v některých případech předčila antibiotika. Doplnkové terapie, například terapie rázovou vlnou a laserová terapie, nabízejí další možnosti. Terapie rázovou vlnou dokonce vykazuje potenciál pro obnovení dojivosti bez nutnosti vyřazení mléka z tržní produkce. Přestože antibiotická terapie hraje v prevenci klinických mastitid významnou roli, ekonomické dopady přetrvávají a zemědělci je často podceňují. Toto mnohostranné onemocnění poukazuje na důležitost holistického přístupu k hospodaření, který by mohl zmírnit jeho negativní ekonomický dopad a zhoršení kvality životních podmínek dojného skotu.

**Klíčová slova:** mastitidy; mléčná žláza; dojnice; zánět; hygiena; léčba; antibiotika; chov

# Determination possibilities and eradication of mastitis in dairy cattle

## Summary

The bachelor thesis addresses the issue of mastitis (inflammation of the mammary gland), the various treatment methods currently available, and potential methods of prevention.

Bovine mastitis is a prevalent problem in dairy cattle. It is caused by a combination of microbial and genetic factors, as well as environmental and husbandry-related conditions. The genetic predisposition of dairy cows plays a significant role in their susceptibility to mastitis. The focus of attention has been on the selection of animals resistant to infection through the identification of resistance genes and markers. Environmental factors contribute to the spread of mastitis pathogens, such as inadequate housing, poor ventilation and high animal concentration. Nutritional deficiencies exacerbate immunosuppression during lactation, which further increases susceptibility to infection. Temperature fluctuations caused by climate change are another problem. Higher temperatures favour the growth of mastitis-causing bacteria. To reduce the incidence and impact of mastitis in dairy herds, strategic measures such as improved farm hygiene, biosecurity protocols and genetic selection are essential.

Due to its multiple causes, early detection of mastitis remains very difficult. Breeding for higher milk production increases the risk of mastitis, which has implications for milk quality, cow performance and antimicrobial use. To combat the growing problem of antimicrobial resistance, monitoring somatic cell counts is essential, as is reducing the use of antibiotics. Biosensor technologies offer the potential for automatic detection of mastitis during milking, while infrared thermography has the capacity to assist in the early detection of inflammation and the assessment of udder health. Overall, comprehensive prevention, early detection and control strategies are essential for the maintenance of milk quality, dairy cow welfare and economic profitability.

The pathogens *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* contribute to the complex nature of mastitis. The effectiveness of control measures depends on the environment and source of infection. The clinical and subclinical forms present a diagnostic challenge, with the subclinical cases being more prevalent and more difficult to detect. Various tests, including the NK test (California Mastitis Test CMT), WMT (Wisconsin Mastitis test) and somatic cell count (SCC) in 1 millilitre of milk, have aided the detection of these cases. However, newer methods such as loop-mediated isothermal amplification (LAMP) (amplification of DNA under isothermal conditions with greater specificity and speed than polymerase chain reaction, abbreviated as PCR) show promise for rapid on-farm diagnosis. Despite the challenges, advances in diagnostic technologies offer hope for improved dairy mastitis management and control.

Non-antibiotic strategies such as probiotics, bacteriocins and plant extracts have proven effective in controlling mastitis pathogens. Bacteriocins, such as nisin, demonstrate antimicrobial activity, while plant extracts and essential oils exhibit antibacterial and anti-inflammatory properties. Inorganic nanoparticles exert antimicrobial effects, while

bacteriophages target specific strains of bacteria. Mesenchymal stem cells and extracellular vesicles facilitate tissue regeneration, reducing somatic cell counts and inflammation. Other approaches include nitric oxide-releasing agents, vaccines and antibody therapy, which collectively provide a multifaceted approach to treating and preventing mastitis.

The increasing popularity of ethnoveterinary preparations, such as herbal remedies, is due to their antibacterial and antiviral properties. Immunotherapy has proven effective against mastitis, in some cases surpassing antibiotics. Additional options are offered by complementary therapies such as shockwave therapy and laser therapy. Shockwave therapy even has the potential to restore milk yield without the need for milk withdrawal. Although antibiotic therapy is important in preventing clinical mastitis, the economic impact remains and is often underestimated by farmers. This multifaceted disease serves to illustrate the importance of a holistic management approach in order to mitigate its negative economic impact and deteriorating dairy animal welfare.

**Keywords:** mastitis; mammary gland; dairy cow; inflammation; hygiene; treatment; antibiotics; animal husbandry





## Obsah

<b>1 Úvod.....</b>	<b>9</b>
<b>2 Cíl práce .....</b>	<b>10</b>
<b>3 Literární rešerše .....</b>	<b>11</b>
3.1 Mléčná žláza .....	11
3.1.1 Morfologická stavba mléčné žlázy .....	11
3.1.2 Hormonální řízení mléčné žlázy .....	15
3.1.3 Obranné mechanismy mléčné žlázy .....	16
3.1.3.1 Struk a strukový kanálek jako první bariéra proti infekci .....	17
<b>4 Onemocnění mléčné žlázy.....</b>	<b>18</b>
4.1 Rozeznání patogenů .....	18
4.2 Počátek zánětu v mléčné žláze .....	18
4.3 Vrozená imunita vemene .....	20
4.4 Řešení zánětu .....	21
4.5 Adaptivní imunita .....	22
<b>5 Vliv výživy na imunitu .....</b>	<b>24</b>
5.1 Imunomodulátory .....	25
<b>6 Vliv genetické selekce a abiotického prostředí na vznik mastitid.....</b>	<b>25</b>
6.1 Genetické faktory související s výskytem mastitid.....	26
6.1.1 Identifikace genů a genetických markerů .....	26
6.1.2 Genetická selekce na základě specifických faktorů.....	26
6.2 Vliv abiotického prostředí na výskyt mastitid .....	28
<b>7 Veterinární aspekt.....</b>	<b>29</b>
7.1 Klasifikace mastitid.....	29
7.1.1 Nejčastější patogeny zapříčiňující mastitidy .....	31
7.2 Metody nepřímého vyšetření .....	32
7.2.1 Kalifornský test (CMT) .....	32
7.2.2 WMT test.....	34
7.3 Metody přímého vyšetření .....	34
<b>8 Léčba mastitid a jejich eradikace .....</b>	<b>37</b>
8.1 Aplikace léčiv .....	37

8.1.1	Využití fytochemikálií a živočišných látek pro léčbu mastitid.....	38
8.1.2	Další netradiční způsoby léčby .....	39
8.2	Terapie.....	40
<b>9</b>	<b>Prevence mastitid.....</b>	<b>41</b>
9.1	Diagnostické a preventivní metody zánětu mléčné žlázy .....	42
<b>10</b>	<b>Vliv mastitid na ekonomiku chovu.....</b>	<b>45</b>
<b>11</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>46</b>
<b>12</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>47</b>
<b>13</b>	<b>Seznam použitých zkratek a symbolů.....</b>	<b>72</b>



# 1 Úvod

Běžně užívaný termín „mastitida“ pro zánětlivou reakci lokalizovanou ve žlázách vemene je odvozen z řeckého slova „*masto*“ označující mléčnou žlázu a „*itis*“ odkazující na zánět (Blood et al. 2007). Mastitida je definována jako zánět parenchymu mléčných žláz a její charakteristika spočívá ve fyzikální, chemické, obvykle bakteriologické modifikaci v mléce a patologických změnách ve tkáních daných žláz (Radostits et al. 1997). Jedná se o významné onemocnění dojeného skotu představující problém pro mlékárenský průmysl v podobě ztrát spojených se snížením produkce a kvality mléka, náklady na léčbu, vyřazením mléka a úhynem skotu (Bradley 2002; Busanello et al. 2017). Mastitida, také nazývaná jako zánět mléčné žlázy, je charakterizována infekcí, která má různý etiologický původ, avšak nejčastěji k ní dochází v důsledku napadení bakteriemi, jež vyvolají zánětlivou reakci (Deb et al. 2013; Fuenzalida et al. 2015). Předpoklad je takový, že bezprostředně po dojení patogeny volně pronikají do strukového kanálku, který může zůstat rozevřený po dobu jedné až dvou hodin (Jones & Bailey 2006). Po vniknutí mikroorganismů do strukového kanálku dochází k jejich množení ve tkáních produkujících mléko, a tedy započítí infekce (Asfaw & Negash 2017).

Mastitidy dělíme dle typu projevu primárně na klinickou a subklinickou. Klinická mastitida se vyznačuje abnormální produkcí mléka a také se může projevovat alterací vemene nebo klinickými systémovými příznaky (Pinzón-Sánchez & Ruegg 2011). Subklinický typ mastitidy způsobuje přesun zánětlivých buněk do vemene bez změny vlastností mléka nebo alteraci vemene, což vede k navýšení SCC (počet somatických buněk v 1 mililitru mléka) (de Freitas Guimarães et al. 2013). V případě subklinické mastitidy může dojít ke snížení produkce mléka o 10 až 20 %. Dále má nežádoucí účinek na složky a nutriční hodnotu mléka (Iraguha et al. 2015). Kromě toho, že tato subklinická forma mastitidy vede k obrovským ztrátám v množství nadojeného mléka, subklinicky napadená zvířata se stávají trvalým zdrojem nákazy pro ostatní jedince ve stádě (Swami et al. 2017).

Intramamární infekce se zdá hlavní příčinou vzniku mastitid u skotu, přičemž běžnými patogeny vemene jsou streptokoky, stafylokoky a koliformní bakterie (Ruegg 2017). Vzdávající tlak na snížení používání antimikrobiálních léčiv v mlékárenském průmyslu vyplývá z obav čím dál více se vyskytující antimikrobiální rezistence a s ní spojených rizik ohrožení veřejného zdraví. Právě samotná prevence a léčba mastitid jsou hlavními důvody používání antimikrobiálních léčiv v mlékárenském průmyslu (EMA-EFSA 2017). Proto by prevence měla být přizpůsobena původci onemocnění k zaručení účinnosti, ekonomické výhodnosti a spolehlivosti preventivního opatření a také protože k různým druhům patogenů je potřeba jiných léčebných postupů (Lago et al. 2011a; Lago et al. 2011b; Griffioen et al. 2016).

Mléčný skot, jenž je chován především v intenzivních chovech, musí být v perfektní fyzické kondici, aby byl schopen dosahovat vysoké doживosti, avšak výskyt lézí a infekcí v chovu dojnic není výjimkou. Z těchto onemocnění představují právě mastitidy největší ekonomické ztráty v mnoha zemích světa (Petrovski et al. 2006).

## **2 Cíl práce**

Práce byla psána formou literární rešerše. Hlavním cílem bylo popsání dostupných informací o nejčastěji se vyskytujícím onemocnění dojeného skotu, tedy mastitidách. Důraz byl kladen na metody stanovení onemocnění čili detekci výskytu a následně na přesné určení původce onemocnění. Dílčím cílem, který byl popsán v další části práce, jsou možnosti léčení, resp. eradikace, a to jak za využití antibiotik, tak i dalších podpůrných forem léčby.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Mléčná žláza

Savci, nejrozšířenější skupina živočichů, se vyznačují především svou funkcí sekrece mléčné žlázy. Ačkoli morfologie a evoluční vývoj se u jednotlivých druhů savců značně liší, mléčná žláza u skotu patří jednoznačně k nejrozvinutějšímu typu (Pandey et al. 2018). K vývoji mléčné žlázy dochází již ve fetálním období jedince. K její primární roli se řadí dodání nezbytných živin narozenému mláděti, v období postpartum ve formě takzvaného kolostra. Kolostrum obsahuje rovněž protilátky zajišťující ochranu a správný fyziologický vývin potomstva (Nickerson et al. 2011).

U dojného skotu bylo pomocí genetické selekce, vylepšení technologií, a i samotné výživy navýšeno celkové množství vyprodukovaného mléka. Produkce mléka překračuje konzumaci narozeným teletem, taktéž původní fyziologickou kapacitu daného orgánu. Z tohoto důvodu, také z hlediska ekonomické důležitosti a možnosti detekce patologického jevu, je zásadní podrobná znalost anatomie a fyziologie mléčné žlázy (Nickerson et al. 2011).

#### 3.1.1 Morfologická stavba mléčné žlázy

Spojené mléčné žlázy tvoří vemeno krávy a zároveň samotný orgán. Jednotlivé žlázy se vyskytují ve dvou řadách na každé straně mediální linie těla v oblasti třísel. Vyskytují se zde dvě funkční žlázy (čtvrtě) na každé straně. Pravá a levá polovina vemene jsou separovány mezivemennou brázdou (*sulcus intermammaricus*). Kožní epitel rozprostřený po celém povrchu vemene se vyznačuje jemnou strukturou s chloupky (s výjimkou povrchu struků) (Pandey et al. 2018).

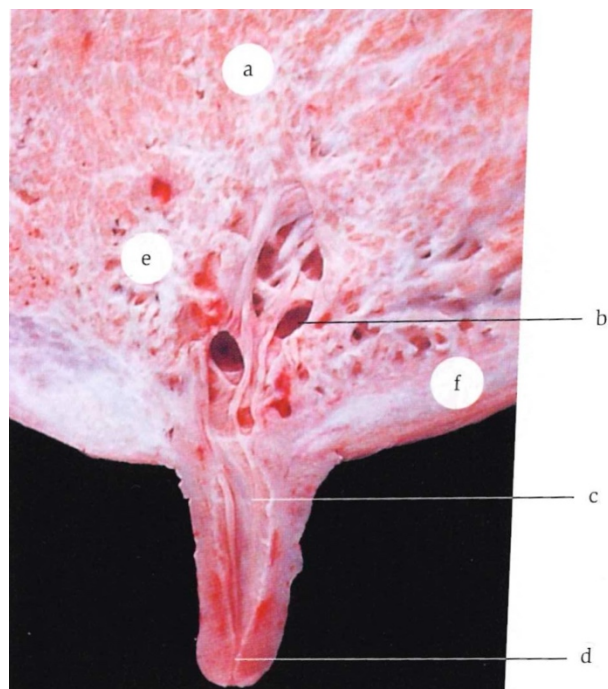
Struk má konický nebo cylindrický tvar. Tyto elastické struktury slouží jako vývod mléka pro každou ze čtyř mléčných žláz. V běžném případě jeden struk odvádí mléko z jedné mléčné žlázy. Žádné potní ani mazové žlázy se nenachází uvnitř struku (Hurley 2010). Tvar a velikost struku (respektive mléčná produkce vemene) je čistě individuální. Kůže pokrývající struk má jemný charakter při naplněném vemeni, po vyprázdnění se jeho charakter mění na vrásčitý. Přibližně u 50 % krav dochází k výskytu jednoho až dvou nepravých struků, takzvaných pastruků. Některé z těchto struků se otevírají do normálních žláz, avšak není to pravidlem. I proto se nejčastěji odstraňují před dosažením jednoho roku života krávy. Falešný struk nemá žádný vývodný kanál, tudíž nedochází k žádnému spojení s vnitřní strukturou vemene (Pandey et al. 2018).

Vemeno se řadí mezi kožní žlázy, a tedy se nachází mimo tělní dutinu. Vazy a další tkáně, upevňující vemeno k tělní dutině krávy, mají značnou důležitost pro správný průběh laktace. Podpurný závěsný systém vemene (*ligamentum suspensorium mammae*) se skládá nejprve z kůže kryjící žlázu a pod ní se nachází subkutánní řídké vazivo (*superficial fascia*) spojující kůži se spodnější tkání. Břišní povázka tvoří volnější spoj mezi dorzálním povrchem předních čtvrtek vemene a abdominální stěnou. Pokud dojde k uvolnění této tkáně, vemeno se může odtrhnout od abdominální stěny. Laterální list se z velké části skládá z fibrózní tkáně (s trochou elastických vláken) vyvstávající z pánevní spony a rozpíná se dopředu a dozadu ze stydké

oblasti. Když laterální list dosáhne vemene, tak se roztáhne a pokračuje směrem dolů po vnějším povrchu vemene pod povrchem, až se dotkne žluté břišní povázky (Pandey et al. 2018).

Hluboký laterální list neboli vnitřní část laterálního listu také vyvstává z pánevní spony, ale je tlustší a z většiny tvořen fibrózní tkání. Hluboký laterální list pokračuje dál po vemeni, až ho skoro obklopuje. Toto vazivo je připevněno ke konvexním laterálním povrchům vemene pomocí vícero lamel, které prochází do žlázy a stávají se tak součástí intersticiální konstrukce vemene. Laterální listy společně tvoří podpůrný systém pro vemeno. Pravý a levý laterální list nepokračují až na spodní část vemene a jejich fibrózní struktura značí, že se nenatahují při naplnění vemene mlékem. Z toho vyplývá, že střed vemene má sklon se oddalovat od těla souběžně s naplňováním vemene. Mediální list se stává nejdůležitějším z částí podpůrného závěsného systému u skotu. Jeho skladba spočívá ve dvou přilehlých elastických potazích vycházejících z abdominální stěny, které jsou připevněny k mediálním placatým povrchům dvou polovin vemene. Mediální list má schopnost se natahovat spolu se vzrůstajícím objemem vemene a umožňuje tak zvyšování hmotnosti žlázy. Mediální list se nachází ve středu gravitačního pole vemene. Tento vaz od sebe částečně odděluje levou a pravou polovinu vemene. Tenká membrána, jež nelze zpozorovat pouhým okem, odděluje přední a zadní čtvrtky (Hurley 2010).

K syntéze mléka dochází v mikroskopických alveolech. Při kumulaci v alveolárním sekrečním lumenu část mléka stéká směrem dolů do mlékovodů a posléze do žlázové a strukové části mlékojemu. Tento proces umožňuje krávkě akumulovat více mléka ve vemeni mezi dvěma dojeními nebo sáními telete. Popis mlékojemu je názorně vyobrazen pomocí Obrázku 1. Je to objemná mléčná cisterna nebo dutina,



Obrázek 1: Podélný řez strukem a mlékojემem jedné čtvrti mléčné žlázy krávy: a – žlaznaté těleso, b – žlázový oddíl mlékojemu s vyústěním hlavních mlékovodů, c – struk a struková část mlékojemu, d – strukový kanálek, e – mlékovody ve žlázovém parenchymu, f – kůže a podkoží vemena (Hofírek et al. 2009)



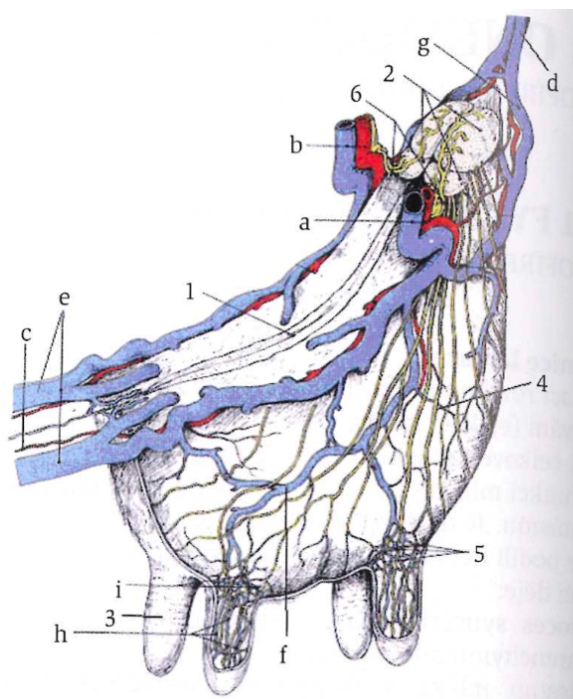
kde může být uloženo 100 - 400 ml mléka, a která se individuálně liší tvarem a velikostí. Žlázo­vá část mléko­jemu (*sinus lactiferous*) přechází přímo do strukové části mléko­jemu. Struková část mléko­jemu (*sinus papillaris*) je dutina nacházející se uvnitř struku, která vychází ze žlázo­vé části (mléčné cisterny) a je tvořena nespočtem podélných, kruhovitých přehybů ve sliznici vystýlající vnitřní stranu struku. K vyprázdnění veškerého mléka ze strukové části a část ze žlázo­vé cisterny dochází díky procesu sání telete. Proximální region (báze struku) strukové části mléko­jemu značící předěl mezi strukovou a žlázo­vatou částí mléko­jemu se nazývá prstencovitá slizniční řasa (Hurley 2010).

Strukový kanálek (*Ductus papillaris*) je jediným otvorem žlázy mezi vnitřním sekrečním systémem a vnějším prostředím. Strukový kanálek má funkci hlavní bariéry proti intramamární infekci. Kanálek je uzavřený kruhovým svěračem hladké svaloviny, který jej obepíná. S postupem laktace se průchodnost kanálku snižuje, zatímco délka kanálku se prodlužuje. Místo přechodu dvouvrstevného cylindrického epitelu mléko­jemu ve vrstevnatý dlaždicový epitel strukového kanálku je tvořeno slizničními přehyby slizniční výstelky na vnitřním konci strukového kanálku. Při tlaku způsobeným naplněním vemene může dojít k překrytí otvoru kanálku těmito útvary. To může sloužit jako místo pro průchod leukocytů opouštějící výstelku struku (teat lining) a vcházející do strukové části mléko­jemu. Strukový kanálek je obklopen svazkem podélných i kruhovitých vláken hladké svaloviny. Mezi dojením hladká svalovina udržuje strukový kanálek uzavřený. Strukový kanálek je rovněž tvořen keratinem nebo látkami podobných struktur, které slouží jako bariéra proti patogenním bakteriím (Riservati 2009).

Při dojení krávy se kruhový svěrač strukového kanálku zrelaxuje, čímž dovolí otevření otvoru kanálku. Otvor strukového kanálku pak zůstane otevřený po dobu minimálně jedné hodiny po skončení dojení, což umožňuje vstup bakterií dovnitř mléčné žlázy. Z toho důvodu je snaha udržet krav nějakou dobu po dojení ve stoje. Můžeme toho docílit například formou podání krmiva bezprostředně po dojení, což je žádoucí pro minimalizaci kontaminace konce strukového kanálku před jeho opětovným uzavřením. Během období stání na sucho (krávy se nedojí) je kanálový vývod efektivně utěsněn keratinovou zátkou. Krevní oběhový systém, přívod krve je extrémně důležitý pro správnou funkčnost mléčné žlázy. Všechny prekurzory mléka pochází z krve. Na jeden litr mléka syntetizovaného vysoko-produkční krávou prochází vememem v průměru 400 až 500 litrů krve, to znamená ~280 ml za sekundu. Celkový krevní objem vemene pro laktující krávy je 8 % jejich celkového objemu krve v těle, zatímco pro nelaktující se pohybuje okolo 7,4 %. Dva až tři dny před porodem (prepartum) dochází k 2–6násobnému zvýšení průtoku krve v mléčné žláze. Snížení produkce s postupem laktace není způsobena snížením průtoku krve, ale úbytkem sekrečních epiteliálních buněk procesem naprogramované buněčné smrti (apoptózy) (Hurley 2010).

Pokud kráva nadojí 60 litrů za den, mléčnou žlázou musí cirkulovat (cirkuluje) 30 000 litrů, což vytváří značný nápor na organismus (Riservati 2009). Systém cév mléčné žlázy je výstižně ukázán na Obrázku 2. Stehenní tepna vycházející ze zevní kyčelní tepny, která je propojena se zevní stydkou tepnou, pokračuje ve formě mléčné tepny. Mléčná tepna se dělí na přední, střední a zadní tepnu zásobující vemeno. Malé množství krve se také dostává do mléčné žlázy stydkou tepnou (z vnitřní kyčelní), ale zásobuje pouze vrchní zadní část této žlázy. Ohyb ve tvaru písmene S, takzvaný sigmoidní ohyb, formuje zevní stydká tepna (*arteria pudenda externa sinistra et dextra*) těsně pod páteřním kanálem. Právě tvarování tepny umožňuje

roztahování vemene směrem dolů při jeho plnění mlékem, aniž by docházelo k namáhání cév (Hurley 2010).



Obrázek 2: Cévy mléčné žlázy krávy: a, b – zevní stydká tepna a žíla (*a. et v. pudenda externa sinistra et dextra*), c – a. *epigastrica cranialis superficialis (sinistra et dextra)*, d – vnitřní stydká tepna a žíla (*a. et v. pudenda – ramus mammarius*), e – kraniální žíla vemena (*v. mammaria cranialis*), f – nitroorganové tepny a žíly vemena, g – kaudální žíla vemena (*v. mammaria caudalis*), h – tepny a žíly struku, i – proximální cévní prstenec struku; 1 – závěsný vaz vemena (*lig. suspensorium mammae*), 2 – mízní uzliny vemena (párové *Inn. mammarii*), 3 – pravostranný struk přední čtvrtě vemena, 4 – mízní cévy parenchymu vemena, 5 – pleteň mízních cév struku, 6 – eferentní mízní cévy z mízních uzlin směřující do tříselného kanálu spolu s krevními cévami (Hofírek et al. 2009)

Žíla je 2-3krát větší než tepna. Žíly vystupují z mléčné žlázy anti-paralelně s tepnami. Na každé straně jsou tři žíly vedoucí krev ven z mléčné žlázy. Zevní stydká žíla (*vena pudenda externa sinistra et dextra*) odchází z vemene paralelně k zevní stydké tepně (2-3 centimetry diametrálně). Zevní stydká žíla vystupuje v tříselném kanálu jako družice cévy a přidává se k zevní kyčelní žíle. Zevní stydká žíla je družice zevní stydké tepny a pokračuje ve směru podobnému tepně s výjimkou toho, že krev protéká v opačném směru. Subkutánní abdominální žíla (mléčná žíla, *vena epigastrica cranialis superficialis*) je žíla opouštějící žlázu v předním konci předních čtvrtí a pokračuje podél abdominální stěny. Jedná se o velkou žílu, jež je viditelná v břišní části krávy. Do tělní dutiny vstupuje v mečové krajině skrz útvar nazývaný mléčná studna a vyprazdňuje se do *vena thoracica interna*. Perineální žíla (zadní mléčná žíla) zanechává zád' žlázy paralelně k perineální tepně, pokračuje dorzálně a kaudálně k perineu, otočí se okolo ischiální oblouku a připojí se k vnitřní stydké žíle (*vena pudenda – ramus mammarius*). Žilní okruh tvořen anastomózou (anatomické spojení) mezi přední a zadní

mléčnou žlázou zabraňuje zastavení krevní cirkulace žilného proudění při pozici krávy v leže. Mízní uzliny vemene (*Inn. mammarii*) jsou rozsáhlé stejně jako žíly a jsou k nim umístěny paralelně. Mízní uzliny (supra mamární lymfatické uzliny) se liší počtem od 1 až 7 a velikostí 4 až 10 centimetrů a nacházejí se nad kaudálním předělem úpatí mléčné žlázy. Většina eferentních lymfatických uzlin se vyprazdňuje do supra mamárních lymfatických uzlin (Riservati 2009).

Několik aspektů nervového systému mléčné žlázy hraje důležitou roli ve správné funkci. Inervace uvnitř vemene je řídká ve srovnání s ostatními tkáněmi v těle. Sensorické nervy se nalézají ve strucích a kůži. Sensorické nervy jsou kritické pro zahájení aferentní nervové dráhy reflexu ejekce mléka. Nervový vstup do vemene se skládá z aferentní nebo sensorických vláken a aferentní nebo sympatetických vláken. Aferentní nervy pocházejí ze tří různých zdrojů. Tyto zdroje jsou první lumbální, druhý lumbální, třetí lumbální a čtvrtý lumbální nerv, přičemž jsou všechny spojeny dohromady v inguinální nerv. Poslední částí je perineální nerv. Jedná se o odvětví nervů složených z vláken druhých, třetích a čtvrtých sakrálních spinálních nervů. Vemeno je také protkáno nervy připojenými k hladké svalovině oběhového systému a k hladké svalovině mezilalůčkových vývodů mlékovodů. Přesto tu ale není žádná inervace řídicí přímo tkáň mléčné produkce. Zásobování vemene motorickými nervy je plně autonomní nebo sympatetické. Neurony nervových vláken jsou lokalizovány na laterálních rozích míchy. Tkáň vemene jsou kontrolovány duálním mechanismem. Přesto parasympatická vlákna nebyla nalezena v potních žlázách kůže a jiných podobných kožních struktur. Jelikož mléčná žláza má strukturu kožní žlázy, parasympatická vlákna nebyla ve vemeni nalezena (Riservati 2009).

### 3.1.2 Hormonální řízení mléčné žlázy

Výše produkce dojnic souvisí s trvalou laktací neboli schopností kontinuální produkce mléka po dobu laktace. Trvalá laktace pak úzce souvisí s populací buněk mléčné žlázy a jejich sekreční aktivitou. Na proliferaci, sekreční aktivitu a úmrtnost těchto buněk, tedy fyziologické mechanismy odehrávající se v mléčné žláze, má vliv řada faktorů – zejména hormonální řízení vemene (Pal et al. 2019).

Nejvýznamnějšími hormony jsou růstový hormon, signální dráha somatomedinu typu IGF-1, hormony štítné žlázy, prolaktin, kortizol, progesteron, insulin, oxytocin a estrogen. Vývoj mléčné žlázy, sekreci mléka, a tak zmíněné hormony regulují celkovou produkci mléka (Tucker 2010).

Bovinní STH je peptid hormon vytvářený hypofýzou (podvěskem mozkovým), jehož efekt zprostředkovává IGF-1 (Hadsell et al. 2008). Bovinní somatotropin udržuje buněčnou populaci a proliferaci buněk v pozdní laktaci. V souvislosti s STH byl také pozorován nárůst celkové mléčné produkce. Mezi somatotropinem a prolaktinem se vyskytuje hormonální interakce. Pokles v koncentraci STH může vést k následnému snížení 15 % v produkci mléka, u prolaktinu k 50% redukci a v případě kombinovaného nedostatku až k 85% snížení v produkci mléka (Tonner et al. 1995).

IGF je primárně produkován z jater jako podnět růstového hormonu. IGF zamezuje možnosti, aby nastala buněčná apoptóza. IGF také řídí progresi buněčného cyklu (Hadsell et

al. 2002). S prodloužením sekrece IGF ve vemeni dojde k prodloužení laktace (Flint et al. 2001). IGF je kontrolován řadou IGFBP. U skotu existují čtyři typy (2, 3, 4 a 5). IGFBPs mají především funkci proteinového nosiče pro IGF. V případě navázání blokují jeho sekreci (Baumrucker & Erondu 2000). Spojením IGFBP-3 s IGF nastává inhibice životnosti buněk vedoucí k apoptóze, což je děj důležitý v involuci mléčné žlázy. Se signifikantním nárůstem tohoto procesu dochází následně k úmrtí buněk. Naopak pokles apoptózy buněk nastává v průběhu laktace. Pokud dojde k nadměrné funkci IGFBP-3 v mléčné žláze, sníží se epitelové tkáně, což současně vede ke snížení produkce mléka (Flint et al. 2001).

Prolaktin reaguje společně s STH, stimuluje IGF-1 a zároveň inhibuje IGFBP-5, čímž zabrání efektu apoptózy (Flint et al. 2001). Takže po odstavu mláděte, kdy nastane snížení prolaktinu, je apoptóza stimulována pomocí IGFBP (Sorensen & Knight 2002). TRH stimuluje sekreci thyroid hormonů a spouští rychlou sekreci prolaktinu (Freeman et al. 2000). Hormony štítné žlázy v první řadě řídí různé metabolické procesy v těle. V případě mléčné žlázy se vyznačují funkcí diferenciacie epitelálních buněk. Kortizol jakožto jeden z glukokortikoidů je jedním z hormonů, který zastává roli v období puberty, březosti a laktace v koordinaci s dalšími hormony. Pomáhá vývoji mléčné žlázy a sekreci mléka (Capuco et al. 2008).

Působení oxytocinu na myoepitelové buňky navodí jejich smrštění a následnou ejakci mléka. Vyprázdnění mléka poté vede k odstranění inhibitoru zpětné vazby laktace FILu. Zkratka FIL značí mléčný glykoprotein mající funkci zpětné vazby pro blokaci syntézy proteinu epitelálních buněk mléčné žlázy. Redukcí FIL tak dochází k syntéze mléka (Peaker & Wilde 1996).

Krmení tyroproteinem (ionizovaným kaseinem) skotu zvyšuje celkovou produkci mléka o 10 % v rané laktaci a o 15 až 20% v pozdní laktaci (Buhimschi 2004).

### 3.1.3 Obranné mechanismy mléčné žlázy

Schopnost skotu nepodlehout novým intramamárním infekcím záleží na zdatnosti nebo schopnosti imunitního systému mléčné žlázy. Účel imunitního systému nespočívá pouze v prevenci bakteriálních invazí mléčné žlázy, ale rovněž v eliminaci již existujících infekcí a obnovení normální funkce tkání. Komponenty imunitního systému mléčné žlázy se skládají z komplexního systému tkání, buněk, molekul, které společně zastávají funkci protekce proti škále patogenů způsobujících mastitidy. Individuální komponenty mamárního imunitního systému mohou být všeobecně klasifikovány do různých funkčních kategorií zahrnující vrozenou a adaptivní (získanou) imunní reakci. Vrozená imunita zahrnuje řadu rezistentních mechanismů, které mohou být aktivovány během sekund až minut bakteriálního napadení. Naopak adaptivnímu imunitnímu systému může trvat několik dnů, aby se plně aktivoval. Adaptivní imunitní systém je schopen více specifické reakce na konkrétní bakteriální faktory způsobující mastitidu. Tyto dva typy subsystémů imunitní reakce nereagují nezávisle na sobě. Proto je nezbytné pro oba systémy, aby mezi nimi docházelo k interakcím (Sordillo 2018).

Vrozená imunita je začátkem ochrany při prvním vystavení mléčné žlázy patogenům. Tento typ imunity je charakterizován rapidním nástupem, který se objeví během sekund po

počátečním bakteriálním napadení. Ačkoli vrozená imunita je bezprostřední obranná linie, rozpoznání a reakce na bakterie nejsou vysoce specifické a samotná imunitní reakce je pouze dočasná. Dále vrozené imunitní mechanismy nejsou vylepšovány při opakovaném vystavení stejným patogenům. Ochranné mechanismy vrozené imunity mohou být buď lokalizovány v místě napadených tkání mléčné žlázy nebo rychle jsou rychle po aktivaci několika stimuly vyslány krevním oběhem na místo infekce. Hlavní složky vrozené imunity zahrnují fyzickou bariéru konce struku spolu s dalšími druhy celulárních a molekulárních mechanismů pro ochranu mléčné žlázy (Sordillo 2018).

### 3.1.3.1 Struk a strukový kanálek jako první bariéra proti infekci

Pro započetí infekce musí patogeny získat přístup do mléčné žlázy. Z toho důvodu je konec struku brán za první linii lokalizované obrany proti patogenům způsobujícím daný zánět. Hned několik různých mechanismů na konci struku brání vstupu nežádoucím patogenům. Konec struku má svaly typu svěrače obklopující strukový kanál, aby udržoval pevné uzavření mezi dojeními a zabraňoval bakteriální penetraci. Strukový kanálek je také pokrytý voskovým materiálem zvaným keratin původem z epitelální výstelky. Studie zjistily, že akumulace keratinu může zajistit fyzickou překážku bakteriím, zejména v době mimo laktaci, kdy dojde k úplné neprůchodnosti strukového kanálku touto látkou. Lipid komponenty keratinu rovněž obsahují antibakteriální složky mastných kyselin mající jak bakteriostatické, tak baktericidní účinky. Obecně gram pozitivní bakterie jsou více citlivé než gram negativní bakterie ve vztahu k bakteriostatickým a baktericidním účinkům mastných kyselin v keratinu. Ačkoli zmíněné mechanismy keratinu antibakteriální aktivity jsou stále předmětem spekulace, existuje evidence pro předpoklad, že dlouhý řetězec mastných kyselin narušují bakteriální lipid membrány, s výslednou perforací bakteriálních buněk. Taktéž rozdíly v kompozici gram pozitivních a gram negativních bakteriálních buněčných stěn mohou vysvětlit rozdílné antibakteriální účinky keratinu s ohledem na druh bakterií. Více současná evidence předpokládá, že keratin obsahuje proteiny vázající kalcium, které také mohou mít některé z antimikrobiálních aktivit (Smolenski 2015).

Pomocí několika komplementárních mechanismů konec struku může zabránit vstupu patogenům a inhibovat většinu bakteriálního růstu. Mohou nastat i případy či okolnosti, během kterých se tento důležitý typ obrany ocitne v ohrožení. Například během raného období stání na sucho a těsně před telením dochází k rozvolnění hladké svaloviny ve strukovém kanálku následkem kumulace intramamární tlaku a zadržování mléka. Zde je také se zvýšenou incidencí mastitid spojována neúplná formace vrstvy keratinu, a to do dvou týdnů po náhlém ukončení laktace. Před tím, než je možné, aby se svaly zcela smrštily, strukový kanálek zůstává otevřen zhruba jednu hodinu po ukončení procesu dojení. V tuto chvíli se nachází kráva v ohrožení z hlediska možného nástupu bakteriální infekce. Struková antiseptika je proto důležitý a obecně používaný management v praxi potřebný pro optimalizaci této počáteční ochrany (Sordillo & Streicher 2002).

## 4 Onemocnění mléčné žlázy

### 4.1 Rozeznání patogenů

Když patogeny zapříčiňující zánět vemene úspěšně prostoupí konec struku, schopnost zaznamenání přítomnosti bakterií v mléčné žláze je nezbytné pro spuštění vrozené imunity. Lokalizované populace buněk mléčné žlázy jsou schopné usnadněného rozpoznání patogenu a efektivní stimulace několika daných imunitních procesů. Imunitní i neimunitní buňky v mléčné žláze vlastní rozpoznávací PRR receptory, které jsou schopny reagovat s pestrou škálou specifických mikrobů zvaných PAMPs. Příklady těchto PRRs jsou TLRs, které jsou rodinou transmembránových proteinů vyjádřených nejen na populaci leukocytů, endoteliálních buňkách, ale i na fibroblastech distribuovaných skrze mamární tkáň (Jungi et al. 2011; Kumar et al. 2011).

Oba TLR-2 a TLR-4 jsou určité důležitosti v rámci mamární obrany, protože tyto receptory rozpoznávají PAMPs asociované s gram pozitivními (peptidoglykeny) a gram negativními (lipopolysacharidy) patogeny způsobující propuknutí mastitidy. Tyto patogeny zahrnují *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Escherichia coli* (Goldammer et al. 2004, Porcherie et al. 2012). Po rozpoznání patogenu prostřednictvím interakcí PRR-PAMP se aktivují intracelulární signální dráhy, včetně transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B, který řídí expresi několika rozpustných mediátorů spouštějících nástup zánětlivé kaskády (Liang et al. 2004).

### 4.2 Počátek zánětu v mléčné žláze

Zánět je kritickou součástí vrozeného obranného systému. Tento systém by měl odstranit bakterie vyskytující se v mléčné žláze, asistovat při opravě jakéhokoli poškození tkáně, jež se může objevit během bakteriální invaze, a obnovit normální strukturu tkání a jejich funkci. Zánětlivá kaskáda končí nejenom akumulací antimikrobiálních faktorů v mléce, ale zvýšeným pohybem leukocytů periferní krve a dalších komponentů krve plazmy směrem do mléčné žlázy (Aitken et al. 2011). Efektivní zánětlivá reakce mléčné žlázy by všeobecně měla trvat méně než týden a nepůsobit žádné patrné změny mléka nebo mamárních tkání. Nefunkční mamární zánětlivé kaskády přehnaného nebo zdlouhavého rázu však mohou vést k extensivní poruše tkání, která může vyvrcholit nekontrolovanou akutní nebo chronickou mastitidou (Halasa et al. 2007; Aitken et al. 2011; Akers & Nickerson 2011).

Velkou signální dráhou NF- $\kappa$ B jsou produkované rozpustné mediátory řídící nástup zánětlivé kaskády mléčné žlázy (Bannerman 2009, Boulanger et al. 2003). Cytokiny patří mezi jedny z hlavních rozpustných mediátorů produkovaných během všech fází zánětlivé reakce. Cytokiny jsou heterogenní skupina glykoproteinů sekretovaných imunními i neimunními buňkami s kapacitou regulace různých aspektů imunitní reakce, včetně zánětu. Existuje několik různých kategorií cytokinů řazených z hlediska jejich struktury, funkce a původu. Dané

kategorie zahrnují ILs, IFNs, chemokiny (skupina cytokinů s chemotaktickým účinkem), CSFs a TNFs. Cytokiny se vážou na receptory na membránách cílových buněk a mohou vyvíjet autokrinní, parakrinní nebo endokrinní účinek. Individuální cytokiny na sebe mohou vzájemně působit synergicky, aditivně nebo antagonisticky. Například u TNF- $\alpha$  a IL-1 $\beta$  dochází k sekreci rapidně během počátečních fází infekce a mají potentní prozánětlivé funkce. Kdyžto IL-4, IL-10, a IL-17 aktivně podporují rezoluci zánětlivé kaskády (Bannerman 2009).

Cytokiny regulují intenzitu a trvání hostitelské odpovědi na infekci pomocí regulace (posílení nebo inhibice) aktivace, proliferace, diferenciacce buněk zapojených do imunitní reakce. S respektem k zánětlivé reakci, cytokiny jsou esenciální pro usnadnění extravazace leukocytů z krevního oběhu a transportu do místa bakteriální invaze v tkáních mléčné žlázy. Další důležitou skupinou signálních molekul zánětu je rodina potentních mediátorů odvozených od lipidů nazývaných oxylipidy, také známy jako oxylipiny nebo eikosanoidy. Tyto potentní lipid mediátory jsou odvozeny od polynenasaturovaných mastných kyselin a jsou schopné regulovat nezbytně každý aspekt začátku a řešení zánětlivé reakce (Serhan & Chiang 2008; Mattmiller et al. 2013).

Zatímco hodně imunních a neimunních buněčných populací mohou produkovat oxylipidy, makrofágy a endoteliální buňky jsou hlavním buněčným zdrojem ve většině tkání, včetně mléčné žlázy (Ryman et al. 2015, Sordillo 2018). Oxylipidní biosyntéza je iniciována, když makrofágy nebo endoteliální buňky přijdou do kontaktu s PAMPs nebo dalšími zánětlivými stimuly. V momentě vystavení těmto prozánětlivým agonistům jsou polynenasaturované mastné kyseliny osvobozeny z fosfolipidů lokalizovaných v celulárních nebo nukleárních membránách skrz akce fosfolipáz. Tyto substráty mastných kyselin jsou poté oxidovány jiným způsobem než pomocí enzymů, a to prostřednictvím ROS nebo skrz různé enzymatické cesty, zahrnující COX, LOX, a cytochrom P450 (hemový enzym) dráhy pro produkci škály oxylipidů (Sordillo 2018).

Podle typu invazivního patogenu zapříčiňujícího mastitidy, množství a načasování produkce počátečního rozpustného mediátoru se může značně lišit. Například exprese cytokinových transkriptů byla vyšší a rychleji exprimovaná v mléčných žlázách infikovaných *Escherichia coli* ve srovnání s mastitidou *Staphylococcus aureus* (Lee et al. 2006). Vážnost mastitidy může také být asociována se specifickými profily zánětlivých mediátorů, jakožto nadměrně vysoké koncentrace TNF-alfa během těžké akutní koliformní mastitidy (Sordillo & Peel 1992).

Předešlé studie také ukázaly, že zvýšená biosyntéza PGE2 souvisela s bakteriálním růstem a závažností systémového onemocnění v průběhu *E. coli* mastitidy (Pezeshki et al. 2011). Zánět je primárně reakcí mikrocirkulace, kde cytokiny a oxylipidy mají kapacitu přímo interagovat s cévami mléčné žlázy k alteraci vaskulárního tonusu a průtoku krve v postižených tkáních, následnému navýšení vazodilatace kapilár a zvýšení vaskulární permeability potřebné pro migraci krevních leukocytů do místa poškození. Kolektivní reakce vaskulárního endotelu a infiltrace krevních leukocytů do postižených tkání jako důsledek cytokinů a biosyntézy cytokinů a oxylipidů může vést k některým z klasických ukazatelů zánětu, zahrnujících teplo, otok, zarudnutí, bolest a ztrátu funkce (Ryman et al. 2015).

### 4.3 Vrozená imunita vemene

Během zánětu rezidentní a také nově vytvořené leukocyty mléčné žlázy hrají nezbytnou roli v průběhu prvních fází patogeneze. V neinfikovaných tkáních mléčné žlázy jsou lymfocyty a makrofágy predominantními typy leukocytů s relativně nízkým počtem neutrofilů. Distribuce leukocytů se mění v závislosti na fázi laktace. Hlavním typem leukocytů v průběhu zánětu jsou neutrofilové. Příliv neutrofilů je iniciován cytokiny a oxylipidy, které působí přímo na vaskulaturu a způsobují snížení rychlosti krve se současným zvýšením exprese adhezivních molekul na endoteliálních buňkách (Ryman et al. 2015).

Adhezní molekuly na leukocytech se připojí k vaskulárním adhezním buňkám k usnadnění migrace leukocytů z krve na místo poranění (Maddox et al. 1999; Hodgkinson et al. 2007). Neutrofilové nejprve marginují a poté adherují k místnímu endotelu v blízkosti místa infekce. Cytokiny, oxylipidy a další molekuly mediátorů stimulují adherentní neutrofilové, aby se pohybovaly mezi endoteliálními buňkami a procházely bazální membránou do poškozených oblastí tkáně (Aitken et al. 2011; Ryman 2015). Pohyb neutrofilů ve tkáních usnadňují chemotaktické gradienty vytvořené molekulami zánětlivých mediátorů v lokalizovaném místě infekce. Migrace neutrofilů se může objevit rychle a nahromadit se v postižených tkáních do 30 až 60 minut po poranění (Summers et al. 2010). Rychlost a rozsah migrace neutrofilů do tkání mléčné žlázy a mléka jsou považovány za hlavní určující faktory pro vznik nových intramamárních infekcí (Paape et al. 2000).

Důležitým vrozeným obranným mechanismem požití a zabíjení bakterií, který usnadňuje leukocyty mléčné žlázy, je proces označovaný jako fagocytóza. V mléčné žláze, fagocytózu provádějí primárně neutrofilové a makrofágy, ale schopnosti fagocytózy mají i dendritické buňky. Fagocytární proces zahrnuje pohlcení bakterií, kde jsou pak zapouzdřeny v cytoplazmatické vakuole zvané fagolyzozom. Neutrofilové mohou zabít fagocytované bakterie pomocí mechanismu závislého buď na kyslíku nebo proteinech. Zmíněný mechanismus závislý na kyslíku působí během procesu požití, v němž dochází k velkému výbuchu oxidačního metabolismu. Zvýšená spotřeba kyslíku vede k produkci reaktivních meziproductů kyslíku a dusíku, jenž jsou produkovány metabolickým procesem známým jako respirační vzplanutí. Tato mikrobicidní oxidační činidla se nacházejí ve fagolyzozomech, přičemž mají schopnost oxidovat lipidy bakteriální membrány a způsobit tím destrukci patogenu (Paape et al. 2000; Aitken et al. 2011).

Kromě toho mohou být bakterie vystaveny a zničeny několika reaktanty nezávislými na kyslíku, včetně lysozomu, různých kationtových proteinů a laktoferinu. Tyto antimikrobiální elementy neutrofilů jsou také uloženy ve velkých cytoplazmatických granulích jedinečných pro bovinní neutrofilové. Bovinní neutrofilní kationtové proteiny jsou heterogenní skupinou zahrnující členy rodiny katelicidů a beta defenzinů, které vykazují antibakteriální aktivitu proti patogenům spojeným s infekcí mléčné žlázy. Degradované bakterie jsou poté exocytovány z neutrofilů s minimálním kolaterálním poškozením mléčných žláz. Neutrofilové mléčné žlázy mohou pohltnout tuk, kasein a další mléčné komponenty. Fagocytární a bakteriální aktivita těchto buněk se snižuje zvláště během peripartálního období a považuje se za základní příčinu zvýšené náchylnosti k mastitidě během dané fáze laktace. Fagocytární a baktericidní schopnosti neutrofilů však mohou být podstatně zvýšeny v přítomnosti opsonických protilátek proti konkrétním patogenům (Paape et al. 2000; Rainard & Riollot 2006).



Tvorba NET je dalším antimikrobiálním obranným mechanismem ve vrozeném imunitním systému. Patogenní stimulace neutrofilů spouští uvolňování jaderného materiálu (DNA a histonů), stejně tak granulárních proteinů a extracelulárních vláken, jež fungují na způsobu zachycování a zabíjení mikrobů. Studie naznačují, že NET poskytují vysoce koncentrovaná ložiska antibakteriálních látek, které vážou a zabíjejí bakterie nezávisle na fagocytárním vychytávání v mléčné žláze (Lippolis et al. 2006; Grinberg et al. 2008). NET také v některých případech slouží jako fyzická bariéra, která brání dalšímu šíření bakterií ve tkáních krávy. Tvorba NET může být zvláště důležitá pro mléčnou žlázu kvůli jejich schopnosti fungovat v přítomnosti mléka na rozdíl od jiných funkcí neutrofilů, které mohou být v tomto prostředí potlačeny (Lippolis et al. 2006).

NK buňky patří k subpopulaci lymfocytů. Jsou velmi důležité pro přirozenou imunitu mléčné žlázy a charakterizují je velké granulární lymfocyty, jejichž cytotoxická aktivita je nezávislá na MHC. Užití Fc receptorů NK buňkami k účasti na (buňkami zprostředkované a na protilátkách závislé) cytotoxicitě patří mezi jejich jedinečné schopnosti. Cytokiny stimulované NK buňkami mají schopnost zabíjet bakterie uvolňováním baktericidních proteinů. V případě izolace z mléčné žlázy krávy NK buňky vykazovaly baktericidní aktivitu proti *S. aureus*. Toto by mohlo být důležitým aspektem vrozené obrany při prevenci mastitidy (Sordillo & Streicher 2002).

#### 4.4 Řešení zánětu

Začátek zánětu až bakteriální invaze je komplexní a přísně regulovaná reakce. Zatímco rychlá a silná zánětlivá reakce je ochranná, nekontrolovaná akutní nebo chronická zánětlivá reakce a může vést k rozsáhlému poškození tkáně spojovaného s patogenezí onemocnění. Z tohoto důvodu je včasné a přirozené vyléčení zánětu zásadní pro celkové zdraví mléčné žlázy. Řešení zánětu je aktivní událost zahrnující specifické dráhy a mediátory urychlující tento proces. Dané dráhy a mediátory omezují infiltraci leukocytů do postižených tkání, modifikují produkci rozpustných mediátorů, odstraňují buněčný odpad a opravují poškozené tkáně (Tabas & Glass 2013; Buckley et al. 2014).

Základním požadavkem pro dokončení zánětlivé reakce je odstranění patogenů, které způsobily mastitidu a tím spustily zánětlivou kaskádu. Úspěšná neutralizace patogenu signalizuje zastavení syntézy prozánětlivých mediátorů a vede k jejich katabolismu. Alternativně je zvýšena produkce několika protizánětlivých nebo pro rozpouštěcích rozpustných mediátorů. Pokud jsou tedy neutrofilové schopny rychle migrovat z krevního řečiště do mléčné žlázy a účinně eliminovat bakterie, pak by hromadění leukocytů mělo ustát a SCC v mléce se vrátit na úroveň zdravé krávy. Pokud však bakterie přetrvávají, pak zánětlivá reakce přechází do akutního nebo chronického stavu. Prodloužená anebo nadměrná migrace leukocytů z krve způsobuje značné poškození parenchymatických tkání mléčné žlázy, což vede ke snížení produkce mléka (Bannerman 2009).

Studie provedené na lidech a laboratorních zvířatech ukázaly, že řešení zánětu je aktivní proces řízený několika odlišnými rodinami pro resolučních oxylipidů, které zahrnují resolvin,

protektiny a LX (Bennett & Gilroy 2016). Ačkoli některé metabolity odvozené z dráhy COX byly tradičně spojovány se spuštěním zánětlivé reakce, existuje několik metabolitů odvozených od COX, včetně PGD<sub>2</sub>, PGJ<sub>2</sub> a 15deoxy-PGJ<sub>2</sub>, které mají schopnost potlačit různé prozánětlivé signální dráhy. Existují také značné důkazy, které naznačují, že určité PG produkované během nástupu zánětu (například PGE<sub>2</sub>), mohou sloužit jako negativní zpětnovazební signály pro usnadnění řešení zánětu (Ricciotti & FitzGerald 2011).

Aktivní biosyntéza pro resolučních lipidových mediátorů hraje esenciální roli v omezení infiltrace neutrofilů do postižených tkání, zvyšuje zbravení makrofágů apoptotických buněk v postižených tkáních a usnadňuje obnovu tkání k normální funkci (Tabas & Glass 2013).

## 4.5 Adaptivní imunita

Vytvoření adaptivní imunity trvá déle než vytvoření imunity vrozené. Avšak po vystavení mikrobům se adaptivní imunita stává zvláště důležitou v případě, že se jsou patogeny schopny vyhnout nebo nejsou zcela eliminovány obranným systémem vrozené imunity. V kontrastu s běžným projevem vrozené imunity, adaptivní imunita dokáže vyvolat imunitní reakce na specifické faktory spojenými s bakteriálními patogeny, nazývanými antigeny. Fascinující vlastností adaptivního imunitního systému je schopnost rozeznat a reagovat na miliardy jedinečných antigenů, se kterými může přijít do kontaktu. Pokud k setkání se s antigenem dojde více než jednou, zvýšený stav imunitní reaktivity nastává v důsledku imunologické paměti. Pamětní reakce je poté mnohem rychlejší, poměrně silnější, déle trvající, a často více efektivní v odstraňování patogenů v porovnání s počátečním vystavení konkrétnímu antigenu. Ke specifické imunitní odpovědi dochází pouze tehdy, jsou-li antigeny kombinovány s molekulou MHC na povrchu určitých buněk, což je proces označovaný jako prezentace antigenu. Velké komponenty vrozeného imunitního systému zahrnují Ig molekuly, makrofágy, dendritické buňky, a několik různých lymfoidních populací, které zprostředkovávají rozpoznání specifických patogenních faktorů. Generování účinné specifické imunity zahrnuje dva rozsáhlé typy buněk, včetně lymfocytů a antigen-prezentujících buněk. Skrze membránové receptory (specifickými pro invazivní patogen) jsou lymfocyty schopné rozpoznat bakteriální antigeny. T-lymfocyty a B-lymfocyty jsou odlišné podmnožiny lymfocytů, které se liší funkcí a expresními profily proteinových produktů (Aitken et al. 2011). Pomocné T-lymfocyty produkují cytokiny v odpovědi na rozpoznání antigen-MHC komplexů na antigen-prezentující buňky B-lymfocyty, makrofágy, a dendritické buňky (Sordillo & Streicher 2002 ; Aitken et al. 2011).

Funkce cytotoxických T-lymfocytů (T<sub>c</sub> buňky) zahrnují rozpoznávání a eliminaci pozměněných cizích antigenů, když jsou prezentovány ve spojení s molekulami MHC 1. třídy. V mléčné žláze se předpokládá, že T-lymfocyty chrání epitelální buňky mléčné žlázy proti intracelulárním patogenům, jakmile mikrobiální antigeny objeví na buněčném povrchu. Někteří vědci si nejsou zcela jistí, že se T<sub>c</sub> buňky podílí ve funkci „lapačů“, které odstraňují staré či poškozené sekreční buňky v mléčné žláze (Sordillo & Streicher 2002).

Hlavní podskupinou lymfocytů jsou  $\gamma\delta$  T-lymfocyty, které v raném věku skotu tvoří více než 50 % celkového množství kolujících lymfocytů. Vzhledem ke značnému počtu zajišťují časnou obranu proti intracelulárním infekcím, a to v době, kdy nejsou ostatní obranné složky adaptivního imunitního systému zcela akceschopné (Hein & Mackay 1991; Guerra-Maupome et al. 2019). Od tradičních  $\alpha\beta$  T-lymfocytů se tyto nekonvenční T-lymfocyty odlišují svým souborem vlastností. V raném věku skotu se postupně utvářejí jako klíčová populace lymfocytů s vlastnostmi jak adaptivní, tak vrozené imunity, a tím pádem slouží jako most mezi dvěma rameny imunitního systému (Guerra-Maupome et al. 2019).  $\gamma\delta$  T-lymfocyty na rozdíl od  $\alpha\beta$  T-lymfocytů nevyžadují prezentaci antigenům v kontextu MHC 1 a 2, případně mohou rozpoznávat nezpracované antigeny přímo prostřednictvím  $\gamma\delta$ TCR (gama-delta T cell antigen receptor) (Baldwin et al. 2021). Funkční podskupiny skotu lze klasifikovat na základě exprese dvou různých tříd WC1. Receptor WC1 poté může být rozdělen do podskupin WC1.1<sup>+</sup> a WC1.2<sup>+</sup> (Wang et al. 2011; Hsu et al. 2015).  $\gamma\delta$  T-lymfocyty exprimující receptor WC1.1<sup>+</sup> se podílejí na eradikaci virových infekcí, vylučují IFN- $\gamma$  a IL-17 (Rogers et al. 2005; McGill et al. 2013).  $\gamma\delta$  T-lymfocyty exprimující receptor WC1.2<sup>+</sup> mají imunomodulační funkci (Guerra-Maupome et al. 2019; Baldwin et al. 2021). Po stimulaci tyto buňky produkují protizánětlivé cytokiny jako je IL-10 a TGF- $\beta$  (Hoek et al. 2009; Guzman et al. 2014; Guerra-Maupome et al. 2019).

Biologické funkce  $\gamma\delta$  T-lymfocyty jsou primárně spojeny s protekcí epiteliálních povrchů. Tyto buňky mohou také hrát roli při infekčních onemocněních, a proto poskytují důležitou linii obrany proti bakteriálním onemocněním, jako mastitida. Sekrece a tkáň mléčné žlázy exprimuje vyšší procento  $\gamma\delta$  T-lymfocytů ve srovnání s periferní krví. Skutečnost, že procento těchto buněk významně klesá v mléčné žláze v době zvýšené náchylnosti k onemocnění naznačuje, že tyto lymfocyty mohou představovat základní obrannou linii proti patogenům způsobujícím mastitidu (Baldwin & Telfer 2015).

Primární role B-lymfocytů je produkce protilátek, také zvaných Ig, proti invazivním patogenům. B-lymfocyty používají membránou vázané molekuly protilátek pro rozeznání specifických patogenů. Po rozpoznání, B-lymfocyty mohou internalizovat, zpracovávat a prezentovat antigen v kontextu molekul MHC 2. třídy T-lymfocytům. T-lymfocyty jsou aktivovány a začnou vylučovat určité cytokiny, včetně IL-2, které zase indikují proliferaci a diferenciaci B-lymfocytů na plazmatické buňky produkující protilátky nebo paměťové B-lymfocyty. Na rozdíl od T-lymfocytů zůstává procento B-lymfocytů mezi stádii laktace poměrně konstantní. Makrofágy jsou převládajícím buněčným typem, který se nachází v mléce a tkáních zdravých, involučních a kojících mléčných žláz. Zatímco tyto buňky hrají roli v časných vrozených imunitních odpovědích, jako jsou fagocyty a produkci zánětlivých mediátorů, makrofágy také hrají klíčovou roli ve zpracování a prezentaci antigenu. Protilátky fungují jako rozpustný efektor humorální složky adaptivní imunitní odpovědi. Antigenem aktivované B-lymfocyty proliferují a diferencují se na plazmatické buňky vylučující protilátky. Je známo, že čtyři třídy protilátek nebo Ig ovlivňují obranu mléčné žlázy proti bakteriím způsobujícím mastitidu a zahrnují IgG1, IgG2, IgA a IgM. Každá z těchto tříd se liší fyzikálně chemickými a biologickými vlastnostmi. Koncentrace každé třídy Ig v sekreci mléčné žlázy se liší v závislosti na fázi laktace a infekčním stavu mléčné žlázy. Ve zdravých žlázách je koncentrace Ig během laktace nízká, ale během období bez laktace se pomalu zvyšuje a

maximálních koncentrací dosahuje v průběhu kolostrogenese. Vysoké koncentrace Ig se vyskytují také v mléčné žláze při zánětu (Aitken et al. 2011).

## 5 Vliv výživy na imunitu

Význam mikronutrientů pro podporu základních imunitních reakcí byl nejlépe ilustrován na mléčném skotu se zjevným nedostatkem některých vitamínů a minerálů v peripartálním období, který vedl ke zvýšenému výskytu a závažnosti mastitid (Spears & Weiss 2008).

Výživový stav dojného skotu, zejména v periparturálním období, přímo souvisí s účinností imunitní odpovědi (Sordillo 2016). Nutriční požadavky krav v průběhu produkčního cyklu kolísají a jakékoli špatné řízení dietních požadavků má nepříznivý dopad na imunitu a odolnost vůči chorobám. Splnění nutričních požadavků dojnice v období porodu je zvláště náročné z důvodu zvýšených nároků spojených s nástupem vydatné syntézy a sekrece mléka se současným poklesem příjmu sušiny po otelení. V důsledku toho krávy v rané laktaci zažívají závažnou negativní energetickou a proteinovou rovnováhu, která přímo souvisí s dysfunkcí zánětlivých reakcí. Změněný metabolismus živin, dysfunkční zánětlivé reakce a zvýšený výskyt a závažnost oxidativního stresu v době otelení mohou vytvářet destruktivní zpětnovazební smyčky, které ohrožují celkový imunitní systém u dojnic v periparturálním období (Sordillo & Mavangira, 2014).

Na základě těchto prvních studií se dnes běžně provozuje příkrmování dojnic v pozdním období stání na sucho před tím, než se pravděpodobně objeví nedostatek v době, kdy brzy dochází k otelení. Existují také přesvědčivé údaje, které naznačují, že vitamín A, měď a zinek mají významné imunoregulační funkce, které mohou optimalizovat vrozené a adaptivní imunitní reakce potřebné pro lepší odolnost vůči mastitidě (Sordillo 2016).

Společným mechanismem, kterým většina těchto mikronutrientů působí, jsou jejich antioxidační vlastnosti a ochrana imunitních buněk před toxickými účinky ROS. Primární funkcí antioxidantů je oddálit, zabránit nebo odstranit oxidační poškození buněčných makromolekul, jako jsou fosfolipidy membrán. Během zánětlivé reakce produkují neutrofilové a makrofágy velké množství ROS, které mají za cíl zničit napadené bakterie. Aby tyto ROS nezpůsobily vedlejší poškození vlastních buněk v těle krávy, je důležité, aby krmivo poskytovalo dostatečné množství antioxidantů, které se mohou začlenit do tkání mléčné žlázy a do buněk imunitního systému (Sordillo 2016).

## 5.1 Imunomodulátory

Cytokiny jsou jednou ze skupin imunomodulátorů, které byly zkoumány z hlediska jejich schopnosti posílit imunitní reakce skotu a snížit nebo zabránit intramamárním infekcím. Vzhledem k tomu, že cytokiny hrají ústřední roli v řízení imunity, jeví se podávání rekombinantní formy těchto imunomodulátorů v době, kdy je normální exprese cytokinů narušena, jako logický přístup ke zvýšení odolnosti vůči onemocnění. Dosavadní studie rekombinantních cytokinů zahrnují IL-1, IL-2, G-CSF a IFN- $\gamma$ . Dostupné údaje poskytují přesvědčivé důkazy, že tyto rekombinantní cytokiny mohou zvýšit funkční schopnosti buněk zapojených do vrozené i adaptivní imunity. Například IFN-gama, G-CSF a IL-1 byly účinné při zvyšování migrace neutrofilů do mléčné žlázy a zvyšování baktericidní aktivity těchto důležitých buněk vrozené imunitní odpovědi (Sordillo & Streicher 2002).

Jak IFN-gama, tak IL-2 také dokázaly zvýšit odpověď T-lymfocytů na specifický antigen, což naznačuje, že tyto cytokiny mohou být účinnými adjuvans pro vakcinaci mastitid (Aitken et al. 2011, Bannerman, 2009). Vzhledem k tomu, že aktivita cytokinů je krátkodobá, jsou pro praktické využití v podmínkách mléčných farem nezbytné strategie, které by mohly zvýšit farmakodynamickou odezvu rekombinantních přípravků. Při řešení této potřeby byla rekombinantní forma kraviho G-CSF kovalentně navázána na polymer rozpustný ve vodě, jenž by prodloužil dobu trvání aktivity cytokinů potřebnou k dosažení terapeutických účinků. Jednorázová dávka PEGylovaného bovinního G-CSF (pegbovigrastrim) podaná přibližně sedm dní před otelením a znovu v den otelení byla účinná při snižování výskytu klinických mastitid během rané laktace (Canning et al. 2017).

## 6 Vliv genetické selekce a abiotického prostředí na vznik mastitid

Vzhledem k tomu, že se jedná o multifaktoriální onemocnění, příčiny mohou být způsobeny vnějším prostředím, ať už z hlediska znečištění, nevhodnému faktoru naskytujícím se přímo v chovu, nebo naopak kvůli oslabení, náchylnosti samotného organismu zvířete. Nejčastěji je tato infekce mléčné žlázy krav vyvolána bakteriálními agens (rovněž mohou být virové či plísňové), avšak velkou roli hrají genetické predispozice, anatomická dispozice, laktace, věk, a hlavně imunologická kondice a s tím i úzce spojené stresové faktory. Při výskytu mastitidy skotu v chovu hraje zásadní roli několik faktorů a těmi jsou mikroorganismy, imunitní reakce, stáje, životní prostředí, výživa, dojírny, čistota a pochopitelně člověk (Schreiner & Ruegg 2003; Sordillo 2016; Jamali et al. 2018; Cheng & Han 2020; Schnitt & Tenhagen 2020).

## 6.1 Genetické faktory související s výskytem mastitid

Genetické založení jedince stejně tak jako zdravotní stav celého organismu patří mezi hlavní faktory projevu zánětu vemene u dojných krav. Úsilí o preventivní opatření mastitid vedlo k pochopení etiologie intramamárních infekcí, včetně pokusů o šlechtění infekci odolných krav. V poslední době se různé studie zaměřují na selekci rezistentních genů vůči mastitidě. Všeobecně se ví o pozitivní genetické korelaci mezi produkcí mléka a výskytem mastitid (stejně tak mezi somatickými buňkami – SCC), s korelačním koeficientem v rozmezí od 0,24 do 0,66 (Chegini et al. 2018).

Šlechtění se zaměřením na odolnost vůči mastitidám nebo očkování může přispět ke snížení potřeby léčby (také snížení používání antibiotik) a rovněž omezit riziko rezistence bakterií vůči antibiotikům (Tiwari et al. 2013; Cheng & Han 2020). Rezistence na zánět mléčné žlázy je komplexním systémem spojených s řadou drah pod působením velkého množství kandidátních genů (Karthikeyan et al. 2016).

### 6.1.1 Identifikace genů a genetických markerů

Výzkum identifikace genů byl prováděn prostřednictvím rozpoznávání patogenů, odběr leukocytů, migrace, eliminace a diferenciací patogenů. Vzhledem k tomu, že se jedná o polygenní onemocnění, je poměrně obtížné identifikovat kandidátní geny určující znaky rezistence. Řízení komplexních vlastností probíhá především prostřednictvím minoritních genů (větší počet genů s nízkým účinkem) ve srovnání s omezeným množstvím genů majoritních (Hayes et al. 2010).

Existuje databáze kandidátních genů a genetických markerů skotu, která pojednává o produkci mléka. Pro mastitidy poskytuje integrovaný výzkumný nástroj pro genomický přístup ke studiu laktace, vývoje vemene a zdraví. Databáze zahrnuje 943 genů a genetických markerů, jenž se podílejí na vývoji a funkci mléčné žlázy (Ogorevc et al. 2009).

### 6.1.2 Genetická selekce na základě specifických faktorů

Publikace uvádějí možný vztah mezi LTF a zánětem mléčné žlázy (Soyeurt et al. 2012; Mohammadnezhad et al. 2021). Gen kódující LTF je jedním z minor genů mající vliv na zdraví mléčné žlázy. Mléko dojnic s klinickou a subklinickou mastitidou obsahuje v průměru vyšší koncentraci laktoferinu než zdravé krávy (Musayeva et al. 2018). Laktoferin vlastní baktericidní a bakteriostatické účinky a k jeho syntéze dochází v epitelu mléčné žlázy (Huang et al. 2012). Jedná se o glykoprotein uvolňující se v infikované mléčné žláze a k tomu zajišťující zranění, migraci a funkci buněk imunitního systému. V průběhu akutního zánětu tvoří zhruba 5 % mléka (Shimazaki & Kawai 2017).

Vápník funguje jako faktor zvyšující diferenciaci a podporující expresi diferenciacně specifických KRT5 genů (Bikle et al. 2012). Přes působení zánětlivých reakcí imunitního systému se většina původců mastitid rychle množí, což nasvědčuje o vhodnosti intramamárního prostředí pro dané bakterie (Rainard 2017; Derakhshani et al. 2018).

Cytokin nazývaný jako IFNGR2 v průběhu infekce zprostředkovává zánětlivou odpověď (Bannerman 2009; Pant et al. 2011; Mann et al. 2019). Při propuknutí intramamární infekce se zvyšuje hladina přítomného IFNG (Bannerman et al. 2004, b; Pant et al. 2011). Následně po navýšení hladiny IFNG se zvýší produkce oxidu dusnatého monocyty. K obraně proti bakteriím se oxidační molekuly stávají klíčovými, přestože tyto molekuly taktéž škodí tkáním vlastního organismu (Burvenich et al. 2003).

Při normálním pH a fyziologické teplotě se v mléce běžně vyskytuje jedna z hlavních syrovátkových bílkovin, takzvaný  $\beta$ -LG (Singh & Gallier 2017).  $\beta$ -LG a LF mají rozdílné účinky na *Streptococcus uberis* a *E. coli* a aditivní účinek proti *Staphylococcus aureus*. Výsledky naznačují, že tyto proteiny hrají komplementární roli v obraně mléčné žlázy proti bakteriální infekci (Chaneton et al. 2011). K poklesu  $\beta$ -LG v mléce dochází v důsledku zvýšeného SCC (Litwińczuk et al. 2011).

Polymorfismus  $\beta$ -LG byl již dříve spojen s SCC u dojnic. Bylo zjištěno, že alela B genu kódujícího  $\beta$ -LG v genotypch AB a BB je spojena s výskytem mastitidy (Luhar et al. 2006) a nový výzkum potvrdil nižší SCC ( $p < 0,05$ ) u krav s genotypem AA ve srovnání s genotypem AB a BB. Z tohoto výzkumu vyplývá vysoká pravděpodobnost výhodné selekce zvířat, která mají genotyp AA, kvůli zvýšení odolnosti jedinců vůči mastitidě (Singh et al. 2015).

Nejvýrazněji zastoupenými geny ve zdravé mléčné žláze jsou CSN2, CSN3, CSN1S1 a CSN1S2 a dvěma hlavními skupinami bílkovin v kravském mléce jsou beta-kasein a syrovátka (Kamiński et al. 2007). Přestože CSN1S1 a CSN2 nejsou nejvýrazněji exprimovanými, v mléčné žláze s mastitidou jsou stále vysoce zastoupeny (Wentao et al. 2019). Nalezl se důkaz, že exprese zmíněných genů je snížena v případě zdravé mléčné žlázy (Coulon et al. 1998; Kamiński et al. 2007).

Obranu proti gramnegativním bakteriálním infekcím, imunitu proti virovým infekcím a určování vlivu změn v expresi proteinu na povrchu monocytů a neutrofilů u zdravých dojnic zajišťuje produkt genu CD14 (diferenční skupina 14) (Wu et al. 2019).

Na základě schopnosti sCD14 tlumit vrozené imunitní reakce na vystavení LPS se předpokládá následná reakce zvýšení citlivosti imunitní kontroly a tím modulace imunitní reakce během mastitidy. Je možné zvýšit koncentraci sCD14, pokud se zavede trans gen kódující sCD14 exprimovaný v mléčném epitelu během laktace. Na základě tohoto kroku se sníží pravděpodobnost vzniku odolnosti mikroorganismů na antibiotika – prostřednictvím zvýšení vrozené imunity a pomocí zvýšení rozpoznávání jádra konzervované molekuly hostitelskou imunitní odpovědí na patogen (například LPS) (Lee et al. 2003; Wall et al. 2009).

SCC mléčných žláz ošetřených rekombinantním sCD14 se navýšil dříve než u mléčných žláz ošetřených fyziologickým roztokem (ve stejných oblastech vemene). Tento výsledek byl přisuzován vazbě LPS produkovaného *E. Coli* na sCD14 a vazbě komplexu LPS/rbosCD14 na epiteliální buňky. Právě tato vazba zahájila migraci somatických buněk do postižených a eliminaci *E. coli*. U sCD14 čtvrtky neproběhla změna v porovnání se dvěma čtvrtkami, u kterých aplikace neproběhla. To potvrzuje fakt, že intramamární injekce sCD14 zabránila infekci *E. coli* (Wang et al. 2006; Védrine et al. 2018).

IL-8 alfa receptor, nacházející se na povrchu neutrofilů a vázající prozánětlivý IL-8 s vysokou afinitou, je kódován genem CXCR1 (Teijeira et al. 2020). Z tohoto důvodu gen pro bovinní CXCR1 vlastní potenciál pro použití jako marker mastitidy u skotu (Alhussien & Dang 2020).

V časnější fázi odpovědi na infekci mléčné žlázy byla pozorována zvýšená exprese IL-10 a IL-6. V průběhu pozdní fáze infekce mastitidy IL-6 reguluje buňky pro kontrolu a ukončení zánětlivé odpovědi (Lewandowska-Sabat et al. 2012).

Se zhoršenou migrací neutrofilů je spojena varianta CC polymorfismu CXCR1. To by mohlo znamenat spojitost nižšího SCC u těchto krav s chronickou mastitidou v důsledku nízkého počtu neutrofilů a/nebo zhoršeného stavu somatických buněk. Všechny studie však neprokázaly spojitost mezi alelou C CXCR1 a náchylností k mastitidě (Pawlik et al. 2015).

V rámci populace fenotypově dobře charakterizovaného mléčného skotu bylo identifikováno celkem 117 SNP a 27 lokusů kvantitativních znaků QTL spojených s odolností vůči mastitidě. Tři QTL, jež nejvíce naznačují celogenomový význam, se nacházejí na genomickém regionu BTA26 a překrývají gen SORCS3, dříve identifikovaný QTL pro délku struků (Kurz et al. 2019).

## 6.2 Vliv abiotického prostředí na výskyt mastitid

Abiotické prostředí (neboli vnější prostředí) obklopující jedince stejně tak jako biotické prostředí (vnitřní prostředí vlastního organismu) hrají velkou roli v imunosupresi, celkovému oslabení organismu a tím většímu riziku propuknutí mastitid u dojných krav. V průběhu laktace vyžadují dojnice vyšší příjem energie i živin na produkci mleziva a mléka. Negativní energetická bilance nastává v případě, kdy energie z přijímaného krmiva neodpovídá požadavkům laktace (Kibebew 2017).

Negativní energetická bilance je úzce spjata s nedostatkem stopových prvků ve stravě (například selenu, zinku, železa, mědi, kobaltu a zinku) a vitamínů (například beta-karotenu, E, C a A), aminokyselin (například lysinu a L-histidinu). Všechny tyto složky napomáhají k rozvoji buněčné a humorální imunosupresi a vedou ke zvýšené náchylnosti k infekcím během laktace (Matsui 2012). Minerály jakožto strukturní složky jsou nezbytné pro správnou funkci nervové signalizace, svalové kontrakce a správné keratóze jako kofaktory mnoha enzymů. Jejich nedostatek zhoršuje aktivitu imunitních buněk nebo vede k malfunkci vrozených obranných mechanismů struků, jež podporuje rozvoj mastitid (Libera et al. 2021).

Environmentální faktory a řízení stáda (management) mají značný dopad na zdraví a welfare zvířat. Pravděpodobnost výskytu mastitidy lze snížit udržováním stáda v čistotě a pohodlí (Weigel & Shook 2018). Konstrukce hal mléčných farem může přispět k zabránění šíření nemocí u dojnic, zvířat v porodním období a telat (Villaruel et al. 2007). Další opatření, jako například vysoká hustota osazení, vlhké podestýlky, znečištěné prostředí, podlahy, nesprávné odvětrávání nebo horké klima, také mohou zvyšovat nárůst patogenů a vznik mastitidy (ohrožení krav). Následně vše vede právě ke zvýšenému výskytu mastitidy (Abebe et al. 2016).

Každá farma by měla mít izolační budovu (karanténní zařízení), kde je možné kontrolovat stav nově zakoupených krav před jejich zařazením do stáda. Dále strategii biologické bezpečnosti zahrnující rutinní postupy údržby budov, které zajišťují minimalizaci interakce skotu s divokou zvěří a kontaminaci krmiva ptáčím trusem nebo jiným odpadem volně žijících zvířat (Baraitareanu & Vidu 2020).



Množení patogenů podporují změny podmínek prostředí, což navyšuje mikrobiální zátěž v syrovém mléce. Zvýšení průměrných teplot způsobené změnou klimatu přispěje k výskytu mastitid v chovech dojnic a bude mít za následek větší ekonomické ztráty (Guzmán-Luna et al. 2022). V teplejších měsících je pravděpodobný nárůst počtu případů onemocnění mastitidou (Vitali et al. 2020; Baraki et al. 2021; Toghdory et al. 2022). Při vysoké populaci much a umístění krav do prostředí, kde jsou struky snadno vystaveny poškození, může dojít k akutnímu onemocnění suchostojných krav a jalovic, takzvané letní mastitidě. Infikovaná čtvrt' vemene je trvale poškozena, a to vede k předčasnému vyřazení jedince z chovu. Klinickými příznaky je otoklá, tvrdá a na omak horká čtvrtka vemene vylučující hustý sekret nepříjemného zápachu (Kibebew 2017).

Imunologická funkceschopnost laktujících a sucho stojných krav může poklesnout při vystavení krav tepelnému stresu. S tím se pojí nepříznivý dopad na zdraví vemene (Fredebeul-Krein et al. 2022).

## 7 Veterinární aspekt

Mastitida projevující se ve formě zánětu mléčné žlázy je v současnosti jedním z nejrozšířenějších onemocnění postihujících mléčný skot (Halasa et al. 2007, Jamali et al. 2018). Okolo 60 až 70 % všech antimikrobiálních látek aplikovaných v chovu dojnic je použito k prevenci a léčbě tohoto onemocnění mléčné žlázy (Stevens et al. 2016). Možný přenos zoonóz a nemocí spojených s toxiny v potravinách úzce souvisí s důležitostí léčby mastitid, aby se zabránilo ohrožení veřejného zdraví (Blum et al. 2008; Zouharova et al. 2008).

Problémem v současné době se jeví schopnost patogenů odolávat antimikrobiálním látkám. Bylo prokázáno, že okolo 62 % izolovaných původců mastitid je rezistentních vůči alespoň jedné antimikrobiální látce (Holko et al. 2019). Při mastitidě zapříčiněné bakteriemi infikují mléčnou žlázu mikroorganismy jako *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis* a *Staphylococcus aureus*. Jejich prevalence je ve světě různá (Wellnitz & Bruckmaier 2012). Nejzávažnějším problémem v některých stádech jsou koaguláza-negativní stafylokoky (CNS) (Vakkamäki et al. 2017).

### 7.1 Klasifikace mastitid

Mastitidy lze klasifikovat mnoha způsoby. (Klaas & Zadoks 2018). Dané onemocnění je charakterizované zánětem mléčné žlázy v důsledku chemického podráždění, traumatu nebo infekcí způsobenou mikroorganismy včetně virů, řas a plísní (fungi), ale zejména bakteriemi (Gomes & Henriques 2016; Mushtaq et al. 2018).

Na základě příčin lze mastitidy rozdělit podle původu na environmentální a kontagiózní. Environmentální mastitidu zapříčiňují bakteriální mikroorganismy, označované jako

environmentální patogeny. Kontagiózní mastitida je naproti tomu způsobena šířením z jiných infikovaných čtvrtí (Klaas & Zadoks 2018).

Mezi environmentální patogeny se obecně řadí *E. coli*, *Klebsiella* (K.) *pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* a *Streptococcus uberis*. Hlavním zdrojem environmentálních patogenů jsou výkaly. Po dobu jedné až dvou hodin po dojení kanál struku přetrvává otevřený a mezi dojeními je konec struku nepřetržitě vystaven působení patogenů v prostředí. Tímto se odlišují kontagiózní patogeny, které obvykle zasahují struk pouze během dojení (Jones & Bailey 2006).

Kontrolní prostředky mastitid jako dezinfekce konců struků po dojení a terapie stáním na sucho se zdají mnohem méně účinné vůči environmentálním původcům mastitid, avšak velmi účinné proti kontagióznímu druhu patogenů (Sommerhäuser et al. 2003).

Kontagiózní mastitidy jsou obvykle způsobeny patogeny jako jsou *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* a *Mycoplasma spp.* (Gomes et al. 2016, Dufour et al. 2019). Jako méně častou příčinou mastitid byly zaznamenány funghi, které se vyskytují nejčastěji v chovech se špatnými ekologickými a hygienickými podmínkami (Zaragoza et al. 2011, Dworecka-Kaszak et al. 2012; Pachauri et al. 2013; Gao et al. 2020). Kontaminace mikroskopickými řasami *Prototheca spp* často souvisí se špatnými podmínkami dojení a dlouhodobým podáváním antibiotik (Milanov et al. 2016; Jagielski et al. 2019; Shahid et al. 2020).

Mastitidy je možné také podle příznaků klasifikovat jako klinický nebo subklinický intramamární zánět. U klinické mastitidy se při propuknutí objeví typické zarudnutí a otok vemene (Gruet et al. 2001). Konzistence mléka ze čtvrtky vemene postižené mastitidou je pozměněna, obsahuje takzvané vločky nebo sraženiny či má vodnatou konzistenci. Zasažené dojnice mohou být pozorovatelně apatické s nechutí k jídlu a zvýšenou teplotou. Počet somatických buněk je zvýšen od standardu 200 000 buněk na mililitr. Subklinický typ mastitidy naopak nemá viditelné příznaky v mléce ani na vemeni (Ruegg 2017).

Klinické formy mastitidy je možné dále klasifikovat podle závažnosti zánětlivé reakce na per akutní, akutní a subakutní (mírnou) (Hogan et al. 1990). V případě per akutní se jedná o nejzávažnější formu mastitidy, jelikož většinou ničí rozsáhlé části tkáně vemene, ovlivňuje celkový stav zvířete a často vede k úhynu (Pretorius 2008).

Pokud zánětlivý proces stále přetrvává po dobu několika týdnů až měsíců a případně pokračuje od jedné laktace k druhé, tak se jedná o chronickou mastitidu. Existuje i subklinický typ, který vykazuje periodické vzplanutí subakutní nebo akutní formy trvající krátkou dobu (Kibebew 2017).

Výskyt subklinické mastitidy se údajně vyskytuje patnáct až čtyřicetkrát častěji než klinická forma a trvá déle. Subklinickou mastitidu je také kvůli absenci příznaků daleko obtížnější zaznamenat a infekce se dále šíří mezi dalšími zvířaty stáda (Seegers & Beaudeau 2003).

Další možnou klasifikací je rozdělení dle patogenity na hlavní a vedlejší patogeny. Hlavními patogeny způsobujícími mastitidy jsou pak *E. coli*, *S. aureus* a streptokoky s tím, že *E. coli* a *S. aureus* mají možný přenos na člověka, jelikož se řadí mezi zoonózy (Heikkilä et al. 2018; Saidani et al. 2018; Zi et al. 2018).

### 7.1.1 Nejčastější patogeny zapříčiňující mastitidy

*Staphylococcus aureus* je jeden z nejvíce rozšířených patogenů zapříčiňujících mastitidy mléčného skotu na světě (Sharma et al. 2011). Jedná se o grampozitivní bakterie, jež jsou schopny přežít v prostředí a na povrchu a se jeví se jako velice nakažlivé (Zadoks et al. 2011). Mléko postižené krávy klinické formy obsahuje viditelné abnormality podobné „vločkám“ nebo sraženinám a jeho celkové množství značně pokleslo (Moreira et al. 2019). Tato bakterie je značným problémem z hlediska její vyvinuté rezistence vůči mnoha antibiotikům (Argaw 2016).

*Streptococcus agalactiae* je další grampozitivní bakterií projevující se zejména u starších krav. Je vysoce nakažlivá a může se rychle šířit stádem (Tomazi et al. 2018). Mléko taktéž může obsahovat sraženiny či „vločky“ a celková mléčná produkce se snižuje (Argaw 2016). Často se léčí pomocí antibiotik, ale výskyt mnoha kmenů rezistentních vůči antibiotikům je znepokojující (Liu et al. 2022). Dobré očkovací programy spolu se správným managementem stáda hrají zásadní roli při zmírnění výskytu této bakterie ve stádech dojníc (Keefe 2012).

*Streptococcus dysgalactiae* je převážně kontagiózní. Tento patogen se šíří především během dojení z krávy na krávu. Je známo, že osídluje kůži vemene a strukový kanál (McDougall et al. 2014). Diagnostický přístup je podobný jako u *Streptococcus uberis*, zahrnující kultivaci vzorků mléka pro identifikaci bakterií vyskytujících se v mléce (Lundberg et al. 2014). Penicilin je nejčastějším používaným antibiotikem pro tento typ bakterie. Účinná kontrola tohoto patogenu zahrnuje například dezinfekci struků a důslednou kontrolu po dojení (Barkema et al. 2009).

*Streptococcus uberis* je hlavním původcem tohoto onemocnění, především jako environmentální původce. Tato bakterie se běžně vyskytuje v půdě a podestýlce a je tak častým kontaminantem kravského vemene (Keefe 2012). Pro diagnostiku se obvykle provádí kultivace mléka, ale používají se také rychlé metody detekce jako PCR (Taponen et al. 2009).

*E. coli* je gramnegativní bakterie, která způsobuje závažné případy klinické mastitidy, zejména na počátku laktace (Goulart & Mellata 2022). Je obecně spojována s environmentálními mastitidami, jelikož se vyskytuje v půdě, výkalech a vodě (Hogan & Smith 2003). Příznaky zahrnují dehydrataci, snížený apetit a zvýšenou teplotu. Mléko se skládá z kousků podobným hrudkám (vločkám) a má charakteristický nepříjemný zápach (Blum et al. 2014). Jedním z nejvíce znepokojujících aspektů je schopnost této bakterie produkovat endotoxiny způsobující řadu závažných zdravotních problémů (Blum et al. 2008).

*Klebsiella pneumoniae* je gramnegativní bakterie spojovaná s environmentální mastitidou, která má schopnost přežívání na povrchích a v prostředí a rychle se přenáší na jedince (Fu et al. 2022; Zheng et al. 2022). Antimikrobiální rezistence není v tomto případě opět výjimkou (Podder et al. 2014).

*Mycoplasma bovis* je mezi bakteriemi jedinečným druhem spojovaným s mastitidou, protože nemá buněčnou stěnu (Carrillo-Casas & Miranda-Morales 2012).. Chronická mastitida způsobená touto bakterií bývá charakterizována vysokou hladinou

somatických buněk v mléce, přičemž bakterie může ve vemeni přetrvávat a způsobit dlouhodobé poškození (Ruegg 2017). Antimikrobiální rezistence vychází primárně z absence buněčné stěny, která je cílem mnoha antibakteriálních látek (Lysnyansky & Ayling 2016).

*Corynebacterium bovis* je grampozitivní bakterie převážně spojována se subklinickou mastitidou u dojnic (Botrel et al. 2010). Díky této skryté povaze je odhalení tohoto patogenu obtížné. Jedním z klíčových indikátorů je zvýšený počet somatických buněk v mléce (Cheng et al. 2020).

## **7.2 Metody nepřímého vyšetření**

Bylo vyvinuto několik testů umožňujících identifikaci změn v mléčné užitkovosti v průběhu infekce mléčné žlázy (Dohoo et al. 2011). Změny v dojivosti a dalších složkách mléka, teplota mléka, barva mléka a aktivita krav také slouží jako markery používané při diagnostice mastitidy (Hovinen et al. 2006; Mollenhorst et al. 2012).

Běžně se v malých i velkých chovech se na detekci mastitidy používá Kalifornský test (CMT) (Obrázek 3) a podobné testy na posouzení zdraví vemene.

### **7.2.1 Kalifornský test (CMT)**

Kalifornský test na mastitidu (CMT), známý také jako rychlý test na mastitidu, Schalmův test nebo NK test. Test je založen na reakci po přidání detergentu obsahujícího činidlo CMT s DNA buňky a indikátorem pH (Bromo cresol purple), který mění barvu při reakci na zvýšení hodnoty pH mléka z normální hodnoty 6,6 na 6,8 nebo vyšší (Constable et al. 2016). Je to detergent vyrobený z alkyl aryl sulfonátu (3 %) a NaOH (1,5 %) přidaného ke vzorku mléka s vysokým počtem buněk, (Iqbal et al. 2006; Viguier et al. 2009).



Obrázek 3: Posouzení Kalifornského testu (NK- mastitis testu) na misce: A =+++ *mastitis*, B = bez nálezu, C = bez nálezu, D = bez nálezu (zdroj: vlastní)

V důsledku reakce dochází ke zvýšení počtu leukocytů a alkality mléka v důsledku infekce. Činidlo CMT rozkládá buňky, „geluje“ DNA a stupeň tvorby gelu indikuje infekci. Test se subjektivně odečítá jako negativní/stopový, +1, +2 a +3 a výsledky se odečítají jako: negativní tekuté mléko bez šmouh nebo sraženiny, + jako slabě pozitivní, „šmouhová“ tekutina, ++ jako „slizké“ a +++ jako želatinové. K maximální tvorbě gelu dochází do 2,5 minuty (Kumar et al. 2020). Množství DNA v mléčném sekretu se tedy kvalitativně odhaduje s přímou korelací mezi DNA a bílými krvinkami v mléce.

CMT hraje významnou roli při zjišťování subklinických mastitid, ale u akutních klinických mastitid se používá jen málo. Bylo zaznamenáno 25 až 50 % ztrát produkce ze čtvrtí s hodnotami CMT +3 (Quinn 1994). Výhodou této metody je relativní rychlost provedení, finanční nenáročnost a lehce nakoupielná. Vzhledem k subjektivitě odečtu a interpretace však poskytuje méně spolehlivé výsledky než přímé počítání somatických buněk (SCC), přesto je přesnější než jiné metody (Galfi et al. 2017).

### 7.2.2 WMT test

Wisconsin Mastitis Test (WMT) je laboratorním testem, který se obvykle provádí na vzorcích mléka z velkoobjemových cisteren. Tato nepřímá metoda používá stejné činidlo jako CMT. Reakce se však neodhaduje, ale měří podle výšky gelu ve zkumavce. Tento postup poskytuje přesnější výsledek než CMT. Výsledky se obvykle uvádí v milimetrech (Viguiet et al. 2009).

Příznivé hodnocení CMT a podobných testů je pravděpodobně odůvodnitelné jejich jako prvních v této kategorii schopnosti posouzení dvou změn ze dvou různých kategorií, a to počtu buněk a pH (Chakraborty et al. 2019; Martins et al, 2019).

## 7.3 Metody přímého vyšetření

Mnoho dalších biomarkerů jako vylučované enzymy indikující poškození tkáně slouží k identifikaci infekce vemene. Ke stanovení aktivity lyzozomální NAGázy nebo laktát dehydrogenázy lze použít kolorimetrické či fluorimetrické testy. Aktivita NAGázy může být spolehlivým ukazatelem subklinické i klinické mastitidy (Hovinen et al. 2016).

V mléce se zvyšuje množství IgG v důsledku porušení bariéry mezi krví a mlékem, ke kterému dochází po intramamární infekci. Jako indikátory k předpovědi přenosu IgG do mléka a tím pádem přítomnosti intramamární infekce, se využívají LDH a SA kvůli jejich schopnosti překonat výše zmíněnou bariéru (Khatun et al. 2022).

Z komerčně dostupných metod pro hodnocení aktivity LDH existuje od společnosti PortaCheck takzvaný UdderCheck<sup>TM</sup>, který využívá papírové testovací proužky a vyhodnocuje změny dle barev v přítomnosti LDH specifického substrátu. Jedná se o kvalitativní porovnávání výsledků určující závažnost onemocnění, a to pomocí barevného grafu. S použitím tohoto diagnostického testu je však spojen limit v možnostech použití a jeho přesnost je nižší v porovnání s jinými metodami jako například Kalifornský test (Kandiwa et al. 2017; Rowe et al. 2020).

Sledování obsahu SCC v mléce stále slouží jako nejpoužívanější metoda pro zjišťování mastitid, zvláště jejich subklinických forem (Riveros-Galán & Obando-Chaves 2021). Vědci úroveň SCC považují za základní kritérium hodnocení zdraví vemene, jelikož s překročením hodnoty SCC dojde také k výraznému poklesu hodnoty mléka. Přes velkou přesnost a spolehlivost přímého měření hladiny SCC se tento test

může zdát nevhodný kvůli nedostupnosti pro některé chovatele z důvodu vysokých nákladů (Costa et al. 2021; Kaskous 2021).

Typem přímé detekční metody je diferenciální počet buněk (DCC), který ukazuje změny v relativních poměrech buněk a může být použit k rozlišení zdravých žláz od žláz zanícených. DCC se provádí na čtvrtkových vzorcích mléka pomocí cytometrie a byl navržen jako platný nástroj pro identifikaci zánětlivých procesů v případech nízkého SCC (Rivas et al. 2001; Pilla et al. 2013).

V minulosti bylo přímé mikroskopické hodnocení somatických buněk považováno za časově náročný proces a nepřesný v důsledku subjektivní interpretace. V současnosti lze díky špičkovým diagnostickým nástrojům jako počítadlu buněk DeLaval, Fossomatic, PortaCheck a Somaticell rychle a automaticky vyhodnotit hladiny SCC u mnoha vzorků (Ferronato et al. 2018; Chakraborty et al. 2019). Čítače buněk založené na průtokové cytometrii, s vysokou kapacitou (fluoro-opto-elektronická metoda) se používají pro měření SCC u velkého počtu vzorků zároveň (400-600 vzorků za hodinu) (Schukken et al. 2003; Martins et al. 2019).

Včasné a přesné odhalení patogenního původce umožňuje vhodnou terapii, včetně volby vhodných antibiotik a vylepšení kontrolních opatření k omezení šíření onemocnění a rezistence vůči antibiotikům. Environmentální patogeny šířících se převážně mimo dojírnou tvoří okolo 90 % patogenů způsobujících zánět vemene. Nejvíce převládajícími druhy jsou *E. coli*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* a *Proteus spp.* (Tomanić et al. 2022).

Jako zlatý standard pro identifikaci původců mastitid se již delší dobu považuje kultivační technika. Proces kultivace spočívá pro stimulaci růstu v inkubaci na kultivačních deskách určitého množství odebraného mléka (z nádrže nebo přímo jedné čtvrtky vemene) po dobu přibližně 18 hodin při stanovených teplotách. Po uplynutí růstové fáze se spočítají jednotky tvořící kolonie CFU a proběhne analýza fenotypu kolonií pro identifikaci patogenů. Vhodné podmínky kultivačního média jsou pro většinou patogenů aerobní, nebo popřípadě anaerobní (například *Mycoplasma spp.*). Hlavní nevýhody bakteriální kultivace jsou nezbytné sterilní podmínky a požadavky na speciální vybavení. Tato metoda také často vyžaduje dlouhou dobu růstu (až 48 hodin) a jeví se náchylná k falešně negativním výsledkům, přičemž se uvádí pravděpodobnost okolo 20 až 50 % (Ashraf & Imran 2018).

Běžně používané kultivační systémy na farmách mohou rozlišit pouze dva hlavní typy patogenů, a to gramnegativní a grampozitivní. Avšak jiné nové systémy mohou pomocí selektivního kultivačního média stimulovat rozvoj specifických mikroorganismů a zkrátit inkubační dobu. Například systém Accumast<sup>TM</sup> má funkceschopnost oddělení stafylokoků, streptokoků a gramnegativních bakterií, a to díky trojitě destičky, která obsahuje tři různá chromogenní média. Pokud určité bakteriální enzymy rozbíjejí chromogeny, jež jsou obsažené v kultivačním médiu, dojde ke změně v barvě (Martins et al. 2019).

Vysoce účinnou a specifickou formou detekce patogenů mastitidy je PCR umožňující přesnou identifikaci patogenů včetně těch, které nerostou pomocí konvenčních kultivačních technik. Ovšem vzhledem k požadavkům na sofistikované vybavení, standardům sterility a kvalifikovaného personálu se stává zavedení PCR na

farmách obtížné. Rovněž přítomnost rozpoznávaných inhibitorů PCR, jimiž jsou tuky. Vápník nebo bílkoviny obsažené v mléce navíc vyžadují aplikaci specifických technik extrakce DNA pro zajištění vysoké kvality výsledků (Hiitiö et al. 2015).

Jako alternativu PCR testu a kvantitativního PCR (qPCR) lze využít izotermickou amplifikaci zprostředkovanou smyčkou LAMP, jež byla popsána jako slibný molekulární nástroj pro rychlou diagnostiku na farmách (Pascual-Garrigos et al. 2021; Khangembam et al. 2021). Jedná se o méně nákladnou metodu, rychlejší, vysoce selektivní pro cílovou sekvenci a vyžadující méně náročné přístroje. Rovněž jakožto izotermický amplifikační přístup může být použit v terénu, přičemž k reakci stačí vodní lázeň nebo tepelný panel (Bosward et al. 2016; Lee 2017). LAMP testy byly vyvinuty na běžné původce mastitid jako *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* nebo *Streptococcus uberis* (Cornelissen et al. 2016; Sheet et al. 2016; Griffioen et al. 2020).

Studie ukázaly možnost identifikace patogenů, jež byly jinými metodami přehlédnuty, pomocí cílově specifických primerů pro amplifikaci prostřednictvím PCR s technologií NGS (sekvencování příští generace) pro obohacení a přesné sekvencování zájmových oblastí genomu patogenů (Anis et al. 2018; Miura et al. 2019; Bi et al. 2021). Tento údaj naznačuje možnost použití této techniky jako diagnostického nástroje a její začlenění do veterinární diagnostické laboratoře nákladově efektivním způsobem, taktéž pravděpodobnost, že v blízké budoucnosti bude možné použití sekvence NGS používat jako rutinní identifikaci mikroorganismů souvisejících s mastitidou (Martins et al. 2019).

Byl navržen magnetický měřič, který je schopen detekovat přítomnost *Streptococcus agalactiae* (streptokoky skupiny B) v syrovém mléce. Jedná se o techniku pro kvalitní detekci buněk *Streptococcus agalactiae* v syrovém mléce pomocí integrovaného cytometru. Buňky *Streptococcus agalactiae* značené 50 nm magnetickými částicemi jsou detekovány ve vzorcích syrového mléka pomocí MR senzorů bez nutnosti předchozí úpravy vzorku. Taktéž doba čekání na výsledky je kratší. To vše patří mezi výhody této metody ve srovnání s optickými metodami detekce (Duarte et al. 2015).

Dále byl vyvinut vizuální test bez amplifikace bez potřeby nákladného vybavení s rychlou a přesnou detekcí *Escherichia coli*, založený na četných zlatých nanočásticích (AuNPS) zachycených na povrchu magnetických mikročástic (Deb et al. 2022). Přesto může docházet k falešně pozitivním výsledkům nejčastěji v důsledku aglomerace nanočástic způsobené heterogenitou a EC (electric conductivity) nezávadného mléka. Tomuto lze však zabránit prostřednictvím detergentů (Duarte et al. 2016).



## 8 Léčba mastitid a jejich eradikace

Tento problém značně vytváří ekonomickou zátěž, v Evropské unii konkrétně představuje náklady více než 185 EUR na krávu ročně a celosvětově se navyšuje až na hodnotu 35 miliard USD (Mushtaq at al. 2018; Touza-Otero et al. 2024).

Vzhledem k tomu, že infekce je hlavní příčinou mastitid u skotu, antibiotika jsou již po desetiletí primární léčbou (Krömker & Leimbach 2017). Antibiotika se kravám podávají preventivně pro zamezení propuknutí mastitid během období stání na sucho (Sharun et al. 2021). Pro léčbu zánětu mléčné žlázy se aplikují intramamárně, intravenózně nebo intramuskulárně. Nejčastěji používanými skupinami jsou penicilin, tetracyklin, ampicilin nebo gentamicin (Cheng & Han 2020; Hossain et al. 2017). Přibližně 80 % používaných antibiotik v mléčném průmyslu je určeno ke kontrole a léčbě mastitid (Ashraf & Imran 2020). Lokální podání terapeutik intramamární cestou nabízí pro léčbu mastitid u dojníc několik výhod. Tento typ podání antibiotik totiž umožňuje vysoké lokální koncentrace daných léčiv s minimálními nároky na jeho systémovou absorpci, což snižuje nežádoucí vedlejší účinky (Roberson 2012). Nicméně vzhledem k současnému problému rozvoje AMR je naléhavě vyžadováno odklonění se od nadměrného používání antibiotik v souvislosti s léčbou zánětu mléčné žlázy. Proto se považuje za nezbytné provádět výzkumy na inovativní ne antibiotické strategie, jež mohou účinně předcházet mastitidě nebo ji léčit (Gomes & Henriques 2016).

Hlavním cílem každého očkovacího programu je vyvinout specifickou imunitní odpověď proti patogennímu agens, zabránit vzniku nových infekcí a snížit patologické následky infekcí, které se vyskytnou. Vakcíny, jež mohou účinně zabránit novým infekcím mají navíc tu výhodu, že zmírňují šíření nakažlivých patogenů ve stádě a snižují potřebu antivirotik k léčbě mastitid. Imunologickým základem vakcín proti mastitidě je stimulace adaptivní imunitní odpovědi na specifické antigenní determinanty. Vakcína má přitom potenciál posílit buněčnou imunitu zaměřenou proti některým původcům mastitid a zvýšit specifické protilátky v krvi i mléce. Většina předchozích pokusů o vývoj vakcín byla zaměřena na mastitidu vyvolanou *S. aureus* nebo *E. coli*. Menší důraz byl kladen na posouzení možnosti vývoje vakcinačních strategií proti streptokokům a mykoplazmám (Ismail 2017; Nickerson & Sordillo 2017).

### 8.1 Aplikace léčiv

Většina ne antibiotických alternativ léčby je založena na bio mimetických postupech, jež se inspirovaly prostředky používanými organismy k udržení homeostázy, přežití nebo k obraně. Mezi tyto metody patří bakteriociny, fytochemikálie (rostlinné extrakty a esenciální oleje), probiotika a bakteriofágy. Nově se také zkoumaly inovativní varianty jako nanočástice a antimikrobiální peptidy ne bakteriálního původu (Angelopoulou et al. 2019; Zaatout 2022).

Podpory v obnovení buněk, zlepšení jejich bariéry a integrace včetně přilnutí k epiteliálním buňkám jsou schopna právě probiotika. Taktéž mají probiotika funkci posílit reakce imunitního systému (Rainard & Foucras 2018; Kober et al. 2022). Tyto gram pozitivní

bakterie patřící především do rodu *Lactobacillus* (Lb.), *Lactococcus* (Lc.), *Bifidobacterium* a *Streptococcus* byly *in vitro* a *in vivo* zkoumány pro prevenci mastitidy skotu nebo terapii (Souza et al. 2018; Li et al. 2021; Shan et al. 2022).

Určité LAB rovněž prokázaly významný potenciál v léčbě přetrvávajících infekcí odstraněním nebo nahrazením biofilmu patogenních bakterií (Wallis et al. 2018; Sevin et al. 2021). U některých druhů například *Lb. Casei* byla zjištěna antimikrobiální aktivita spojená s inhibicí adheze a internalizace patogenu k epiteliálním buňkám (Souza et al. 2018). Nebo *Lb. casei*, včetně *Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum*, které na epiteliálních buňkách mléčné žlázy skotu také modulují imunitní odpověď a zprostředkovávají zánětlivý proces endoteliálních buněk (Fukuyama et al. 2020; Chen et al. 2021; Li et al. 2022).

Výzkum prokázal, že kmeny *Enterococcus mundtii* mohou potlačit infekci a snížit zánět v mléčné žláze. Toto tvrzení bylo demonstrováno na základě histologického vyšetření provedeného 24 hodin po podání (Qiu et al. 2022). Při aplikaci *Lc. Lactis*, *Bifidobacterium breve* nebo *Bacillus velezensis* v modelu mastitidy skotu se zjistilo, že tyto probiotické kmeny daných druhů redukovaly množství patogenů a somatických buněk (SCC) a zároveň podpořily imunitní systém (Kitching et al. 2019; Afroj et al. 2021).

Ribozomálně syntetizované grampozitivními a gramnegativními bakteriemi jsou antimikrobiální proteiny nebo peptidy nazývané bakteriociny (Bennett et al. 2021). Nisin, antibiotikum produkované *Lc. Lactis* je schváleným dezinfekčním prostředkem pro prevenci intramamárních infekcí u mléčného skotu (Ceotto-Vigoder et al. 2016). Tento bakteriocin vykazuje antimikrobiální aktivitu proti *S. aureus*, *S. dysgalactiae* a *S. uberis* zasažení do syntézy buněčné stěny a změně struktury její membrány tvorbou pórů (Kitazaki et al. 2017; Bennett et al. 2021; Pérez-Ibarreche et al. 2021). Přesto bylo objeveno několik bakteriálních kmenů odolných vůči nisinu (Barbosa et al. 2021). Tato skutečnost vedla k bio inženýrsky vytvořeným derivátům nisinu vykazujícím antimikrobiální aktivitu vůči rezistentním kmenům a eradikaci biofilmu (Pérez-Ibarreche et al. 2021). Například Hycin 4244 (produkovaný *Streptomyces hygroscopicus*) působící inhibicí syntézy bakteriálních proteinů, byl účinný proti řadě grampozitivních a gramnegativních bakterií, včetně několika rezistentních kmenů (de Souza Duarte et al. 2018).

### 8.1.1 Využití fytochemikálií a živočišných látek pro léčbu mastitid

Zdraví zvířat mohou potenciálně prospívat rostliny s bohatým zdrojem látek s antimikrobiálními, oxidačními účinky anebo protizánětlivými vlastnostmi. Léčivé fytochemikálie jsou sekundárními metabolity podílející se na obranných mechanismech rostlin. Nejznámějšími a nejstudovanějšími jsou polyfenoly, flavonoidy, alkaloidy a terpeny. Tyto biologicky aktivní látky obsažené v rostlinách se získávají především ve formě extraktů (PEs) nebo esenciálních olejů (EO) (Lopes et al. 2020; Neculai-Valeanu et al. 2021; Manso et al. 2021). Díky svým složkám s potenciální antibakteriální aktivitou jsou PE a EO schopny působit jako bakteriostatika a baktericidy (Manso et al. 2021; Buldain et al. 2022). EO a PE také mohou přispívat k prevenci oxidačního stresu mléčné žlázy, ke kterému dochází během průběhu onemocnění mastitidou. Kromě toho mají antioxidační vlastnosti (Mushtaq et al. 2018).

Extrakt z *Kalanchoe* nebo *Datura stramonium* prokázaly antimikrobiální aktivitu na úrovni komerčních antibiotik jako gentamicin (Yusuf et al. 2022). Při kombinaci PE (nebo například EO z *Melaleuca armillaris*) s antibiotiky byly pozorovány synergické účinky, jež potenciálně umožňují snížení dávky antibiotik při zachování stejných baktericidních účinků (Buldain et al. 2022). Rovněž v případě kombinace EO (například tymol, eugenol, mentol, citral, linalool) s mastnými kyselinami se středně dlouhým řetězcem byla potvrzena aditivní antibakteriální aktivita (Rani et al. 2022a; Rani et al. 2022b). Antibakteriální účinky byly také objeveny u extraktu z moringy, jež snížil invazi a adhezi bakterie *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *S. simulans* k buňkám MAC-T (Cheng et al. 2020). Vhodná aplikace se synergickým účinkem fotochemikálií a antibiotik je také při spojení Aloe vera PE s nízkými koncentracemi antibiotik kloxacillinu nebo ceftiofuru v intramamárním přípravku (Forno-Bell et al. 2021).

Jako potenciální řešení pro snížení závislosti na antibiotikách při léčbě mastitid se ukázal včelí jed (Han et al. 2007). Známy pro své využití v orientální medicíně (například léčba rakoviny nebo roztroušené sklerózy) také vykazuje antibakteriální, protizánětlivé a imunoregulační vlastnosti (Baek et al. 2006; Zhang et al. 2018). Díky těmto vlastnostem se včelí jed zdá slibným pro léčbu v chovech dojnic, a navíc napomáhá ke snížení závislosti na antibiotikách, zkrácení ochranné lhůty, zvýšení produktivity a přispění k welfare zvířat (Castro et al. 2019; Xu et al. 2022). Jako nejlepší navržená metoda aplikace bylo přímé vstříkávání včelího jedu do vemene za užití jehly (Han et al. 2007). Výzkum ukázal nutnost dávky minimálně 12 mg včelího jedu, po dobu léčby delší než 7 dní. Také se zjistilo, že léčba samotným včelím jedem byla negativní proti gramnegativním bakteriím, avšak více senzitivní byly grampozitivní bakterie (Kim et al. 2024).

### 8.1.2 Další netradiční způsoby léčby

Viry bakteriofágy se napojují na specifické receptory na povrchu hostitelských bakterií, injektují jejich genetický materiál a replikují se uvnitř buňky (Guo et al. 2021). Tento proces replikace vede ke zničení bakterie a následné uvolnění nově vytvořených fágů infikujících další bakterie (Xi et al. 2020; Barasuol et al. 2022). Produkce enzymů, lyzinů a endolyzinů určuje lytickou schopnost jednotlivých fágů. Tyto enzymy mají zásadní funkci v rozkladu buněčné stěny hostitele na konci replikačního cyklu (Wang et al. 2021). Z důvodu údajné specifčnosti, kterou endolyziny mají na rozdíl od antibiotik se tyto enzymy jeví jako slibná alternativa v boji proti rezistentním bakteriálním kmenům. Další výhodou je minimalizace nežádoucích účinků na hostitele při použití na léčbu mastitid (Vander & Meyer 2018; Srujana et al. 2022). Určité druhy fágů mají odlišné schopnosti v potlačení zánětu mléčné žlázy. Například fág *Aerococcus viridans* snížil množství bakterií a zmírnil poškození tkáně (Xi et al. 2020). Snížení koncentrace *E. coli* a exprese prozánětlivých cytokinů, včetně prevence tvorby biofilmu bylo obdobně provedeno prostřednictvím fágu vB\_EcoM-UFV13 (da Silva Duarte et al. 2018).

Anorganické nanočástice (NP) společně se zlatostříbrnými NP se prověřovaly z hlediska eradikace původců mastitid *Pseudomonas aeruginosa* a *S. aureus*. Syntéza těchto NPs je snadná a metoda *in vitro* prokázala snížení mikrobiálního růstu pomocí antimikrobiálních účinků (Alves-Barroco et al. 2022). Výzkum na laboratorních myších při

intramamární aplikaci měděných NP na léčbu mastitidy způsobené *S. aureus* vedl ke zlepšení úrovně oxidačního stresu a snížení bakteriální zátěže (Taifa et al. 2022). Baktericidní aktivita proti *Pseudomonas*, eliminace již existujících biofilmů a zabránění tvorby nových byla dosažena použitím polymerních NP na bázi chitosanu (Rivera Aguayo et al. 2020). Nanočástice stříbra a oxidu měďnatého byly použity k eradikaci škodlivých zárodků. Studie taky prokázaly vysokou kvalitu a absenci negativních účinků na tkáň mléčné žlázy u komerčně dostupných nanočástic (Ren & Guogang 2009; Prakash et al. 2022).

Slibný potenciál alternativy k antibiotikům také plyne z využití peptidů jiného původu než bakteriálního, a to konkrétně antimikrobiálních peptidů (AMP). Například peptid Polybia MP-1 z jedu vosy *Polybia paulista* projevil antimikrobiální aktivitu proti určitým izolovaným kmenům z kravského mléka se zánětem a to kmenů *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* a *E. coli* (Shah et al. 2021; Shah et al. 2022).

Universální sloučenina kyselina kávová ukázala pozoruhodné antibiofilmové a antibakteriální vlastnosti, omezení bakteriální infekce. Navíc dále nejen zmírnila zánět, snížila adhezi buněk *E. coli*, ale rovněž redukovala oxidační stres v mamárních bovinních epitelálních buňkách (BMEC) (Liu et al. 2019; Xu et al. 2022).

Jak mezenchymální kmenové buňky (MSC) tak jimi vylučované extracelulární vezikuly (EVs) mají antimikrobiální schopnost. Podporují reparaci a regeneraci tkání, taktéž jsou schopny měnit homeostázu tkání v případě propuknutí infekcí vyvolaných *S. uberis*, *S. aureus*, včetně rezistentních kmenů vůči meticilinu (Peralta et al. 2020; Danev et al. 2023). Dále MSC a jejich EVs přispívají ke snížení SCC a zároveň zvýšení exprese protizánětlivých cytokinů (Ghai et al. 2022).

Mezi metody léčby mastitid nebo jejich prevence se taky řadí dusíkaté látky uvolňující oxid dusnatý (Regev et al. 2018), vakcíny (Li et al. 2023) a terapie protilátkami (Wang et al. 2019).

## 8.2 Terapie

Imunomodulátor a glykoprotein laktoferin nacházející se v různých tělesných tekutinách a to slinách, v mléce, slzách a bronchiálním hlenu, byla objevena jako potenciální ne antibiotická antimikrobiální látka (Gomes & Henriques 2016). Pokud se laktoferin zkombinuje s  $\beta$ -Lactoglobulin, projeví se navíc účinek proti *S. aureus* a jejich samostatné působení na různé bakterie tak doplňuje spektrum antibakteriální aktivity (Kutilla et al. 2003; Gomes & Henriques 2016).

Viry nazývané bakteriofágy jsou schopny infikovat bakterie a způsobovat jejich smrt nebo integraci genetického materiálu fága do chromozomu hostitelské bakterie (lyzogenii) (Nale & McEwan 2023). Metoda na bázi fágové terapie se čím dál více běžně využívá (Qolbaini et al. 2021). Avšak rezistence bakterií na fágy při použití pouze jednoho druhu fágu byla zjištěna již dvě hodiny po terapii fágy. To se projevilo opětovným růstem kultur po lýze (Teng et al. 2022). Pro zlepšení účinnosti procesu lýzy, omezení rozvoje rezistence a lyzogenie lze optimalizovat léčbu kombinací více fágů (koktejl) (Porter et al. 2016). Úspěšnost této strategie byla prokázána příznivými účinky kombinací různých morfologií fágů při odstraňování

několika druhů bakterií způsobujících mastitidu skotu. Například koktejl čtyř fágů byl vyvinut pro *E. coli* a koktejl se dvěma nebo třemi druhy fágů pro *S. aureus* (García et al. 2009; Guo et al. 2021). Přesto terapie prostřednictvím fágů může přinést další komplikace. V jednom případě bylo zjištěno, že fág, jenž vstoupil do lyzogenní fáze, obsahoval gen způsobující rezistenci k více typům antibiotik (Wipf et al. 2014).

Při léčbě a prevenci klinických a subklinických mastitid se stále více používají etno veterinární přípravky, jako rostlinné léky a byliny, protože většina těchto rostlin nemá vedlejší účinky jako alopatické léky a jsou relativně neškodné zdraví. Tyto byliny s antibakteriálními a antivirovými účinky mohou pomoci s ošetřením mírných až středně závažných bakteriálních infekcí, rovněž jsou v léčbě konkrétních onemocnění mnohem účinnější než samotné léky (Kebede & Daheza 2024).

V rámci biologické léčby mastitidy imunoterapie z hlediska usmrcování zárodků Y-komplex (zesilovač fagocytózy) předčil antibiotika a nesteroidní protizánětlivé léky (Leitner et al. 2013). Avšak kombinace antibiotik a nesteroidních antirevmatik jako meloxicam, zlepšila u dojnic plodnost (McDougall et al. 2016; Sharun et al. 2021).

Terapie rázovou vlnou, takzvaná akustická pulzní léčba (APT), generuje pulzující tlakové impulzy za pomoci ručního zařízení. Efekt těchto vln pronikajících do hlubších tkání rozbíjí jizvy chronických ran a tím stimuluje re vaskularizaci (Leitner et al. 2013). Stejně tak interferenční terapie a laser IV. Třídy můžou být použity ve spojení s APT k měření potenciálu dané léčby (Sharun et al. 2021). V průběhu léčby mastitidy akustickou pulzní léčbou ani po ní není nutné vyřazovat mléko ani identifikovat bakterie. Proto se doporučuje každou dojnici, jež vykazuje příznaky onemocnění mléčné žlázy, ošetřit zařízením APT pro možnost doplnění snížené zásoby mléka (Leitner et al. 2013).

## 9 Prevence mastitid

S mastitidami přichází mnoho komplikací, ať už ekonomických, tak celkově zdravotních a při snaze udržení welfare zvířat. Proto by se měl klást větší důraz na samotnou prevenci mastitid, aby k jejímu výskytu či propuknutí nedocházelo. Avšak tím, že toto onemocnění mléčné žlázy má mnoho původců různého charakteru se předčasná detekce stává více náročnou záležitostí. Šlechtění skotu na vyšší produkci mléka souvisí s vyšším výskytem mastitid a zvětšeným počtem somatických buněk, konkrétně leukocytů, sekrečních buněk a dlaždicových buněk dostávajících se do mléka v rámci reakce na intramamární infekci (Cheng & Han 2020). Zdraví vemene má pro produkci mléka zásadní význam. Ovlivňuje kvalitu mléka, užitkovost skotu a užívání antimikrobiálních látek na farmách (Neculai-Valeanu et al. 2021).

Diagnostika subklinických mastitid dojnic, stejně tak včasné odhalení klinicky vyjádřených mastitid vyvolávajících makroskopické změny v sekreci mléka jsou podstatnou součástí zlepšení zdravotních parametrů chovu. Velký počet somatických buněk v mléce a přítomnost bakterií mají značný negativní vliv na produkci a kvalitu mléka (Ruegg 2017; Chakraborty et al. 2019).

Imunitní systém krávy je často potlačen po delší dobu v produktivním věku, což má schopnost negativně ovlivnit její reakci na vystavení patogenům (Schukken et al. 2011; Dahl et al. 2020).

Zánětlivý proces vyvolaný infekcí mléčné žlázy mění propustnost bariéry mezi krví a mléčnou žlázou, tím pádem do mléka proniká více iontů, somatických buněk a bílkovin. Předchozí studie dokazuje vliv počtu somatických buněk na produkci mléka, kromě množství bílkovin a laktózy v mléce (Santos et al. 2004; Chen et al. 2021; Rearte et al. 2022).

Současné snížení produkce mléka se zvýšením SCC je především převážně odrazem fyzického poškození epitelových buněk, jež jsou zodpovědné za tvorbu mléka (Benić et al. 2018). Možná příčina poklesu laktózy se také uvádí poškození alveolárních epitelálních buněk. Laktóza významně přispívá k zajištění osmotického tlaku mléka, pokles jejího množství vyvolává výrazný pokles doživosti. Navíc se do mléka přenášejí z krve ionty sodíku a chloridu, které mají udržovat osmotickou rovnováhu, přičemž se jejich celkový obsah zvyšuje na abnormálně vysokou hladinu (Kandeel et al. 2019).

## 9.1 Diagnostické a preventivní metody zánětu mléčné žlázy

Pojem kvalita mléka zahrnuje nutriční, fyzikálně-chemické, hygienicko-sanitární a organoleptické vlastnosti. Jako indikátor výskytu mastitid ve stádech dojníc se používá počet somatických buněk mléka (SCC), také k informování zpracovatelů o kvalitě syrového mléka a k posouzení úrovně hygieny na farmách. SCC se z několika screeningových testů kvality mléka považuje za nejspolehlivější test pro detekci asymptomatického typu mastitidy (subklinické mastitidy). V některých zemích dokonce výrobci dostávají úhrady za dodávku mléka s nízkým somatickým počtem z důvodu jeho žádoucích technologických vlastností a delší trvanlivosti (Alhussien & Dang 2018).

Antibiotika jsou tradičně považována za primární způsob zásahu proti bakteriálním infekcím u dojného skotu, především pokud se jedná o mastitidy, kde hrozí šíření mikrobiální rezistence do životního prostředí v podobě reziduí. Šíření bakterií rezistentních vůči mnohonásobným antibiotikům MAR tak představuje značný problém pro bezpečnost, a tak je v současné době kladen důraz na snížení spotřeby antibiotik v chovech hospodářských zvířat za účelem přechodu na „model farem s nízkým obsahem antibiotik“ (Barkema et al. 2015; Krömker & Leimbach 2017; El-Sayed & Kamel 2021). Stanovení cílů SMART (Specific, Measurable, Acceptable, Realistic, and Time-bound) je prvním krokem v procesu, po kterém následuje vypracování akčního plánu k dosažení těchto cílů (Lam et al. 2011).

Obecně platí, že přítomnost zánětu a subklinické mastitidy je indikována hladinou SCC vyšší než 200 000 buněk na mililitr mléka. Ve většině evropských zemí byl limit pro komercializaci mléka na farmách stanoven na 400 000 buněk na mililitr, zatímco ve Spojených státech je limit stanoven na 750 000 buněk na mililitr a cena mléka klesá s množstvím buněk SCC blížícím se zákonnému limitu (Karzis et al. 2017; Alhussien & Dang 2018; Kelly et al. 2018).

Zvýšená SCC vždy vykazuje přítomnost infekce v některé ze čtvrtí vemene, avšak TBC rozdílně ve většině případů indikuje hygienické nebo sanitační nedostatky při dojení (Blum et al. 2020; Halasa & Kirkeby 2020; Markusson 2021).

Zásadní vliv na kvalitu mléka a zdraví vemene má efektivita rutinního dojení a výkonnost zařízení na sběr mléka (Ohnstad 2012). Jako hlavní fyzická bariéra slouží kanálek struku, jenž brání průniku bakterií do vemene skrz strukový kanál. Mezi jednotlivými dojeními by mělo být hladké svalstvo obklopující strukový kanál stažené a tím strukový kanál bezpečně uzavřen. Uzavření brání vniknutí infekce do strukového kanálu a odtud do vemene (Zigo et al. 2021).

Přítomnost keratinových buněk bohatých na lipidy nacházejících se uvnitř strukového kanálku posilují zmíněný obranný mechanismus kanálku struku. V případě pružné a hladké kůže bez lézí je v nejlepším stavu pro poskytnutí přirozené bariéry proti invazi patogenů způsobujících mastitidu. Možný stres působící na struky i na krátkou dobu ovlivní jejich přirozenou obranyschopnost. Největší důraz se sice klade na hyperkeratózu konců struků, avšak stejně tak krátkodobé narušení struků v podobě vředů, změny barvy, překrvení, otoků dokládají špatnou dojivost (Odorčić et al. 2019; Okkema & Grandin 2021).

Bodování konců struků se značí jako užitečná technika posouzení míry hyperkeratózy konců struků ve stádě dojnic. Bylo doloženo výzkumem, že porucha prokrvení souvisí se zvýšeným rizikem infekce mastitidou, jež není dosud klinicky patrná. Hyperkeratóza je spojena s mastitidou a zapříčiňuje změny v okolní tkáni strukového kanálu, což umožňuje snadný průnik bakterií do mléčné žlázy. Z toho plyne nezbytnost provádění bodového hodnocení konců struků v pravidelných intervalech u nejméně 20 % stáda pro sledování změn (Pantoja et al. 2020).

Laktaci dojných krav lze rozdělit do tří fází: raná, střední a pozdní. Pomocí epitelových buněk mléčné žlázy sekretujících mléko dochází nepřetržitě k tvorbě mléka v laktující mléčné žláze. V rané fázi laktace je mléčná užitkovost nejvyšší. Následně je možné během laktace pozorovat fyziologické snížení produkce mléka. V podobě výzkumu bylo zjištěno, že SCC je výraznější v prvních týdnech po otelení a rapidně dochází k jeho poklesu mezi 25. a 45. dnem po otelení. V pozdní fázi laktace však může opět postupně narůstat (Hagnestam-Nielsen et al. 2009; McDougall et al. 2021).

Pokud nejsou vhodně zavedeny účinné prostředky a strategie pro kontrolu zdraví vemene a prevenci mastitidy skotu, je náročné zajistit kvalitu mléka a mléčných výrobků (Fuquay 2011; Priyashantha et al. 2021).

V průběhu laktace se kvůli onemocnění jedné čtvrtiny vemene může snížit dojivost minimálně o 10 %. Předčasné vyřazování dojnic je také primárně zapříčiněno mastitidami. Finanční ztráty spojovány s mastitidami jsou výdaje na léky, veterinární služby, laboratorní testy a popřípadě dodatečná pracovní síla zemědělců. Ztráty rovněž vznikají v důsledku poklesu produkce mléka, výlevu mléka kvůli reziduím antibiotik a snížené účinnosti výroby mléčných výrobků (Ruegg 2017, Krömker & Leimbach 2017; Lopes et al. 2020).

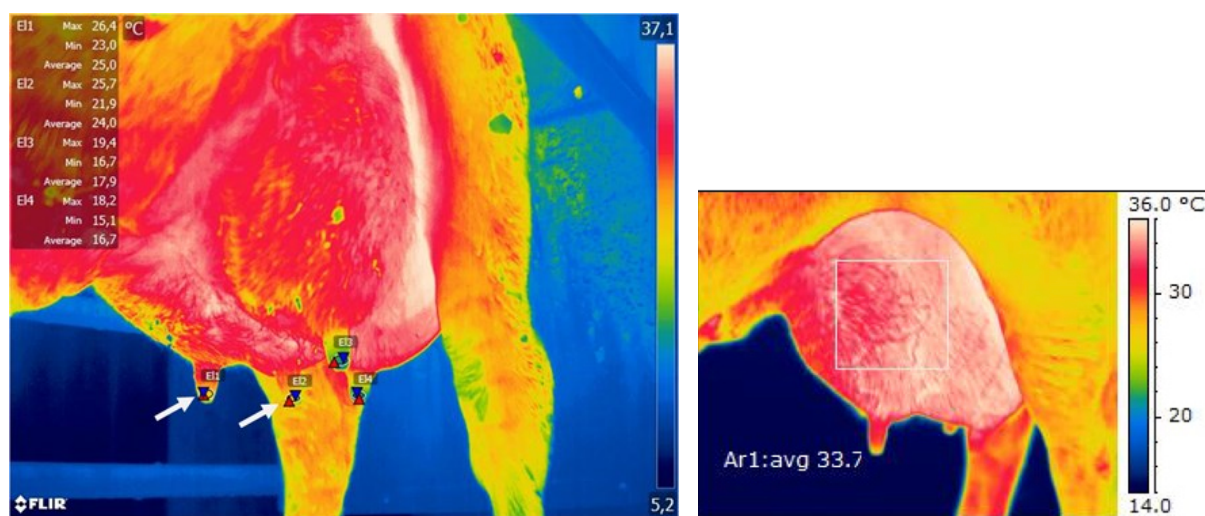
Od svého samotného vzniku až do místa spotřeby prochází mléko dvěma fázemi. První fáze se pohybuje od alveolární tkáně mléčné žlázy až k papilárnímu ústí galaktoforu (papilárnímu kanálu). Naproti tomu druhá část procesu zahrnuje cestu od dojícího zařízení ke spotřebiteli. Současný soubor povinných testů pro kontrolu kvality mléka se vztahuje pouze ke druhé fázi cesty mléka v podobě hygienicko-sanitárních podmínek po nadojení. Dva hlavní

parametry počet somatických buněk (SCC) a respektive TBC tak mohou poskytnout mnoho informací o zdraví vemene a kvalitě mléka (Robles et al. 2020).

Tradiční metoda ručního dojení se ve velké míře vytratila ve prospěch automatizovaného nebo strojního dojení v souvislosti s intenzivním chovem dojnic. Následně došlo k vyvinutí techniky automatické detekce mastitidy skotu založené na biosenzorech. Tento způsob detekce využívá vhodné technologie snímání jako monitorování počtu somatických buněk (ISCC) spolu s elektrickou vodivostí mléka čtvrtek vemene (EC) sloužící k hodnocení zdraví vemene a včasného odhalení mastitidy ve velkochovech (Duarte et al. 2015; Neethirajan et al. 2017; Paudyal et al. 2020).

Zařízení nazývané biosenzory kombinují biologickou složku bio receptoru s fyzikálním převodníkem senzorem. Při interakci biologického rozpoznávacího prvku s cílovým analyzátozem vzniká v důsledku vzájemné interakce kvantifikovatelná signál. Tento signál je poté integrovaným snímačem převeden na data (Alhadrami et al. 2018).

Diagnostické metody jako infračervená termografie (IRT) (Obrázek 4) jsou účinné při hodnocení zdraví vemene a identifikaci čtvrtí s přítomností subklinické mastitidy (McManus et al. 2022). IRT je snadno použitelný, účinný, neinvazivní diagnostický nástroj využívající infračervené zobrazení a měřicí kameru k hodnocení neviditelné infračervené energie (záření) vyzařované kůží nebo povrchem vemene převodem na termální snímky nebo termogramy (Sathiyabarathi et al. 2016). Včasná indikace zánětu nebo i malé změny povrchové teploty lze dokázat za pomoci velmi citlivé termokamery IRT. Společně s mobilní aplikací se IRT může proměnit ve snadný a přenosný diagnostický nástroj (Singh et al. 2021).



Obrázek 4: Infračervená termografie (Knížková & Kunc 2021)



## 10 Vliv mastitid na ekonomiku chovu

Při zánětu mléčné žlázy jakožto multifaktoriálního onemocnění na sebe mají vzájemný vliv patogeny, prostředí a hostitel (kráva) (Cheng & Han 2020). Nejen náklady na antibiotika postupy v managementu, ale také ztráty v mléce (snížení produkce, vyřazování infikovaného mléka), prodloužení doby stání na sucho, úhyn, předčasné vyřazování ze stáda tyto všechny faktory způsobují značné ekonomické ztráty (Bishop et al. 2010). Mezi nepřímé náklady spojeny s výskytem mastitid patří vyřazování krav, výměny jalovic, veterinární služby, selhání reprodukce a samotná léčba tohoto onemocnění (Hogeveen et al. 2019).

Změny ve složení mléka mohou být prakticky v ekonomickém kontextu přehlíženy z důvodu nařízené ochranné lhůty po podání léku (Seegers & Beaudeau 2003; Halasa et al. 2007). Hlavními příčinami ekonomického poklesu na základě klinického a subklinického zánětu mléčné žlázy je také zvýšená potřeba pracovní síly a pokles v prodeji mléka (Huijps & Hogeveen 2008).

Dokonce i po uplynutí ochranné lhůty mléka se produkce nezlepší a ekonomické ztráty zůstávají značné i přesto že antibiotická terapie léčba zabránila přechodu preklinické mastitidy v klinickou mastitidu (Rose et al. 2003). Často dochází ze strany zemědělců ke ztrátám způsobeným zánětem kvůli podcenění působení tohoto onemocnění a nepřijetí daných kontrolních programů (Valeeva et al. 2007).

## 11 Závěr

Mastitida představuje v chovu dojeného skotu přetrvávající problém, jenž negativně ovlivňuje životní podmínky zvířat, ekonomickou udržitelnost a veřejné zdraví. Toto mnohostranné onemocnění, ovlivněné patogeny, faktory prostředí a fyziologií hostitele, poukazuje na složitost jeho potlačení. Ačkoli se tradičně při léčbě používají především antibiotika, obavy z antimikrobiální rezistence a ekonomických ztrát vyžadují zvážení alternativních strategií.

Imunomodulátory, například laktoferin, se slibně projevují jako neantibiotické antimikrobiální látky s potenciálními synergickými účinky v kombinaci s jinými sloučeninami. Bakteriofágy a etno-veterinární přípravky nabízejí nové možnosti cílené antimikrobiální terapie, ačkoli k optimalizaci jejich účinnosti a bezpečnosti by bylo zapotřebí dalšího výzkumu.

Pokroky v imunoterapii, jako je léčba založená na Y-komplexu, a nové terapie, ku příkladu terapie rázovou vlnou, představují slibné alternativy k tradičním antibiotickým režimům a nabízejí potenciální výhody z hlediska účinnosti a regenerace tkání. Diagnostické nástroje, zejména izotermická amplifikace zprostředkovaná smyčkou (LAMP) a sekvenování nové generace (NGS), jsou navíc příslibem rychlé a přesné identifikace patogenů, což by usnadnilo cílené léčebné postupy.

Do budoucna by byly nezbytné komplexní epidemiologické studie, aby bylo možné vypracovat strategie kontroly mastitid uzpůsobené konkrétním podmínkám v zemědělských podnicích. Proaktivní postupy řízení, včetně přísných hygienických protokolů: vakcinace a metody včasné detekce mají zásadní význam pro minimalizaci výskytu mastitidy a s ní spojené ekonomické zátěže, možného rizika ohrožení veřejného zdraví.

Spolupráce mezi výzkumnými pracovníky, veterinárními lékaři a producenty mléka by měla mít zásadní význam při zavádění strategií založených na důkazech s cílem zmírnit výskyt mastitidy a její dopady. Přijetím inovací a informovaným rozhodováním by mohl mlékárenský průmysl usilovat o udržitelné postupy řízení mastitid, které by zajistily jak dobré životní podmínky zvířat, tak ekonomickou prosperitu v odvětví mléka a mléčných výrobků.

## 12 Literatura

- Abebe R, Hatiya H, Abera M, Megersa B, Asmare K. 2016. Bovine mastitis: prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. *BMC veterinary research*, **12**:1-11.
- Afroj S, et al. 2021. *Bacillus velezensis* AP183 inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and proliferation in murine and bovine disease models. *Frontiers in microbiology*, **12**:746410.
- Aitken S, Corl CM, Sordillo LM. 2011. Immunopathology of mastitis: insights into disease recognition and resolution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **16**(4): 291–304.
- Akers RM, Nickerson SC. 2011. Mastitis and its impact on structure and function in the ruminant mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **16**(4):275–89.
- Alhadrami HA. 2018. Biosensors: Classifications, medical applications, and future prospective. *Biotechnology and applied biochemistry*, **65**(3):497-508.
- Alhussien MN, Dang, AK. 2018. Milk somatic cells, factors influencing their release, future prospects, and practical utility in dairy animals: An overview. *Veterinary world*, **11**(5):562.
- Alhussien MN, Dang, AK. 2020. Interaction between stress hormones and phagocytic cells and its effect on the health status of dairy cows: A review. *Veterinary world*, **13**(9):1837.
- Alves-Barroco C, Rivas-García L, Fernandes AR, Baptista PV. 2022. Light triggered enhancement of antibiotic efficacy in biofilm elimination mediated by gold-silver alloy nanoparticles. *Frontiers in microbiology*, **13**:841124.
- Angelopoulou A, Warda AK, Hill C, Ross, RP. 2019. Non-antibiotic microbial solutions for bovine mastitis—live biotherapeutics, bacteriophage, and phage lysins. *Critical reviews in microbiology*, **45**(5-6):564-580.
- Anis E, Hawkins IK, Ilha MR, Woldemeskel MW, Saliki JT, Wilkes RP. 2018. Evaluation of targeted next-generation sequencing for detection of bovine pathogens in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, **56**(7):10-1128.
- Argaw, A. 2016. Review on epidemiology of clinical and subclinical mastitis on dairy cows. *Food Sci Qual Manag*, **52**(6):56-65.
- Asfaw M, Negash A. 2017. Review on impact of bovine mastitis in dairy production. *Adv Biol Res*, **11**(3):126-131.
- Ashraf A, Imran M. 2018. Diagnosis of bovine mastitis: from laboratory to farm. *Tropical animal health and production*, **50**:1193-1202.

- Ashraf A, Imran M. 2020. Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis. *Animal health research reviews*, **21**(1):36-49.
- Baek, Y. H., Huh, J. E., Lee, J. D., Park, D. S. 2006. Antinociceptive effect and the mechanism of bee venom acupuncture (Apipuncture) on inflammatory pain in the rat model of collagen-induced arthritis: Mediation by  $\alpha$ 2-Adrenoceptors. *Brain research*, **1073**:305-310.
- Baldwin C, Telfer JC. 2015. The bovine model for elucidating the role of gammadelta T cells in controlling infectious diseases of importance to cattle and humans. *Mol Immunol*, **66**(1):35–47.
- Baldwin CL, Damani-Yokota P, Yirsaw A, Loonie, K, Teixeira AF, Gillespie A. 2021. Special features of  $\gamma\delta$  T cells in ruminants. *Molecular Immunology*, **134**:161-169.
- Bannerman DD, Paape MJ, Hare WR, Hope JC. 2004. Characterization of the bovine innate immune response to intramammary infection with *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of dairy science*, **87**(8):2420-2432.
- Bannerman DD. 2009. Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. *Journal of animal science*, **87**(suppl\_13):10-25.
- Baraitareanu S, Vidu L. 2020. Dairy farms biosecurity to protect against infectious diseases and antibiotics overuse. In *Antimicrobial Resistance-A One Health Perspective*. IntechOpen.
- Baraki A, Teklue T, Atspha T, Tesfay T, Wayou S. 2021. Prevalence and risk factors of bovine mastitis in southern zone of Tigray, northern Ethiopia. *Veterinary Medicine International*.
- Barasuol BM, et al. 2022. Characterization of novel temperate phages of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk. *Archives of Microbiology*, **204**(11):680.
- Barbosa AAT, de Melo MR, da Silva CMR, Jain S, Dolabella SS. 2021. Nisin resistance in Gram-positive bacteria and approaches to circumvent resistance for successful therapeutic use. *Critical Reviews in Microbiology*, **47**(3):376-385.
- Barkema HW, et al. 2015. Invited review: Changes in the dairy industry affecting dairy cattle health and welfare. *Journal of dairy science*, **98**(11):7426-7445.
- Barkema, H. W., Green, M. J., Bradley, A. J., Zadoks, R. N. 2009. Invited review: The role of contagious disease in udder health. *Journal of dairy science*, **92**(10):4717-4729.
- Baumrucker CR, Erondy NE. 2000. Insulin-like growth factor (IGF) system in the bovine mammary gland and milk. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **5**(1):53-64.
- Benić M, et al. 2018. Bovine mastitis: a persistent and evolving problem requiring novel approaches for its control-a review. *Veterinarski arhiv*, **88**(4):535-557.

- Bennett M, Gilroy DW. 2016. Lipid mediators in inflammation. *Microbiol Spectr*, 4(6). DOI: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MCHD-0035-2016>.
- Bennett S, Ben Said L, Lacasse P, Malouin F, Fliss I. 2021. Susceptibility to nisin, bactofencin, pediocin and reuterin of multidrug resistant *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis* causing bovine mastitis. *Antibiotics*, **10**(11):1418.
- Bi J, et al. 2021. Etiology of granulomatous lobular mastitis based on metagenomic next-generation sequencing. *International Journal of Infectious Diseases*, **113**:243250.
- Bikle, D. D., Xie, Z., Tu, C. L. 2012. Calcium regulation of keratinocyte differentiation. *Expert review of endocrinology & metabolism*, 7(4):461-472.
- Bishop, D. V., Hardiman, M. J., Barry, J. G. 2010. Lower-frequency event-related desynchronization: a signature of late mismatch responses to sounds, which is reduced or absent in children with specific language impairment. *Journal of Neuroscience*, 30(46):15578-15584.
- Blood, D. C., Studdert, V. P., & Gay, C. C. 2007. *Saunders Comprehensive Veterinary Dictionary*, 2166-pp.
- Blum, S. E. et al. 2020. Physiological response of mammary glands to *Escherichia coli* infection: A conflict between glucose need for milk production and immune response. *Scientific Reports*, 10(1):9602.
- Blum, S. E., Heller, E. D., Leitner, G. 2014. Long term effects of *Escherichia coli* mastitis. *The Veterinary Journal*, 201(1):72-77.
- Blum, S., Heller, E. D., Krifucks, O., Sela, S., Hammer-Muntz, O., & Leitner, G. 2008. Identification of a bovine mastitis *Escherichia coli* subset. *Veterinary microbiology*, 132(1-2):135-148.
- Bosward, K. L., House, J. K., Deveridge, A., Mathews, K., & Sheehy, P. A. 2016. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of *Streptococcus agalactiae* in bovine milk. *Journal of dairy science*, 99(3):2142-2150.
- Botrel, M. A., Haenni, M., Morignat, E., Sulpice, P., Madec, J. Y., Calavas, D. 2010. Distribution and antimicrobial resistance of clinical and subclinical mastitis pathogens in dairy cows in Rhône-Alpes, France. *Foodborne pathogens and disease*, 7(5):479-487.
- Boulanger D. et al. 2003. Increased nuclear factor kappaB activity in milk cells of mastitis-affected cows. *J Dairy Sci*, 86(4):1259-67.
- Bradley, A. J. 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. *The veterinary journal*, 164(2): 116-128.

- Buckley CD, Gilroy DW, Serhan CN. 2014. Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. *Immunity*, 40(3):315–27.
- Buhimschi CS. 2004. Endocrinology of lactation. *Obstet Gynecol Clin North Am.*, 31(4):963-979.
- Buldain, D., Gortari Castillo, L., Buchamer, A. V., Bandoni, A., Marchetti, L., & Mestorino, N. 2022. In vitro synergistic interaction between Melaleuca armillaris essential oil and erythromycin against Staphylococcus aureus isolated from dairy cows. *Frontiers in Veterinary Science*, 9:1005616.
- Burvenich, C., Van Merris, V., Mehrzad, J., Diez-Fraile, A., & Duchateau, L. 2003. Severity of E. coli mastitis is mainly determined by cow factors. *Veterinary research*, 34(5):521-564.
- Busanello, M., Rossi, R.S., Cassoli, L.D., Pantoja, J.C.F., Machado, P.F. 2017. Estimation of prevalence and incidence of subclinical mastitis in a large population of Brazilian dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 100:1–9.
- Canning P. et al. 2017. Efficacy and clinical safety of pegbovigrastim for preventing naturally occurring clinical mastitis in periparturient primiparous and multiparous cows on US commercial dairies. *J Dairy Sci*, 100(8):6504–15.
- Capuco A V., Connor EE, Wood DL. 2008. Regulation of Mammary Gland Sensitivity to Thyroid Hormones During the Transition from Pregnancy to Lactation. *Exp Biol Med.*, 233(10):1309-1314.
- Carrillo-Casas, E. M., Miranda-Morales, R. E. 2012. Bovine mastitis pathogens: prevalence and effects on somatic cell count. In *Milk production-An up-to-date overview of animal nutrition, management and health*. IntechOpen.
- Castro, I. et al. 2019. Metataxonomic and immunological analysis of milk from ewes with or without a history of mastitis. *Journal of dairy science*, **102**(10):9298-9311.
- Ceotto-Vigoder, H. et al. 2016. Nisin and lysostaphin activity against preformed biofilm of Staphylococcus aureus involved in bovine mastitis. *Journal of applied microbiology*, 121(1):101-114.
- Constable, P. D., Hinchcliff, K. W., Done, S. H., Grünberg, W. 2016. *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. Elsevier Health Sciences.
- Cornelissen, J. B. W. J., De Greeff, A., Heuvelink, A. E., Swarts, M., Smith, H. E., Van der Wal, F. J., & 1Health4Food—Dutch Mastitis Diagnostics Consortium. 2016. Rapid detection of Streptococcus uberis in raw milk by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Dairy Science*, 99(6):4270-4281.
- Costa, A., De Marchi, M., Neglia, G., Campanile, G., Penasa, M. 2021. Milk somatic cell count-derived traits as new indicators to monitor udder health in dairy buffaloes. *Italian Journal of Animal Science*, 20(1):548-558.

- COULON, J. B., Hurtaud, C., Rémond, B., & VERITE, R. 1998. Factors contributing to variation in the proportion of casein in cows' milk true protein: a review of recent INRA experiments. *Journal of Dairy Research*, 65(3):375-387.
- da Silva Duarte, V. et al. 2018. Genomic analysis and immune response in a murine mastitis model of vB\_EcoM-UFV13, a potential biocontrol agent for use in dairy cows. *Scientific reports*, 8(1):6845.
- Dahl, G. E., Tao, S., Laporta, J. 2020. Heat stress impacts immune status in cows across the life cycle. *Frontiers in veterinary science*, 7:116.
- Danev, N., Harman, R. M., Oliveira, L., Huntimer, L., Van de Walle, G. R. 2023. Bovine milk-derived cells express transcriptome markers of pluripotency and secrete bioactive factors with regenerative and antimicrobial activity. *Scientific Reports*, 13(1):12600.
- de Freitas Guimarães, F., Nóbrega, D. B., Richini-Pereira, V. B., Marson, P. M., de Figueiredo Pantoja, J. C., & Langoni, H. 2013. Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *Journal of dairy science*, 96(5):2866-2872.
- de Souza Duarte, A. F., Ceotto-Vigoder, H., Barrias, E. S., Souto-Padrón, T. C. B. S., Nes, I. F., & de Freire Bastos, M. D. C. 2018. Hyicin 4244, the first sactibiotic described in staphylococci, exhibits an anti-staphylococcal biofilm activity. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 51(3):349-356.
- Deb, R. et al, 2013. Trends in diagnosis and control of bovine mastitis: a review. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, 16(23):1653-1661.
- Deb, R. et al. 2022. Development of gold nanoparticle-based visual assay for rapid detection of *Escherichia coli* specific DNA in milk of cows affected with mastitis. *LWT*, 155:112901.
- Derakhshani, H. et al. 2018. Invited review: Microbiota of the bovine udder: Contributing factors and potential implications for udder health and mastitis susceptibility. *Journal of dairy science*, 101(12):10605-10625.
- Dohoo, I. R., Smith, J., Andersen, S., Kelton, D. F., Godden, S., & Workers'Conference, M. R. 2011. Diagnosing intramammary infections: Evaluation of definitions based on a single milk sample. *Journal of dairy science*, 94(1):250-261.
- Duarte, C. et al . 2016. Semi-quantitative method for streptococci magnetic detection in raw milk. *Biosensors*, 6(2):19.
- Duarte, C. M., Fernandes, A. C., Cardoso, F. A., Bexiga, R., Cardoso, S. F., & Freitas, P. J. 2015. Magnetic counter for Group B Streptococci detection in milk. *IEEE Transactions on Magnetics*, 51(1):1-4.
- Duarte, C. M., Freitas, P. P., Bexiga, R. 2015. Technological advances in bovine mastitis diagnosis: an overview. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 27(6):665-672.

- Dufour, S., Labrie, J., Jacques, M. 2019. The mastitis pathogens culture collection. *Microbiology resource announcements*, 8(15):10-1128.
- Dworecka-Kaszak, B., Krutkiewicz, A., Szopa, D., Kleczkowski, M., & Biegańska, M. 2012. High prevalence of *Candida* yeast in milk samples from cows suffering from mastitis in Poland. *The Scientific World Journal*.
- El-Sayed, A., Kamel, M. 2021. Bovine mastitis prevention and control in the post-antibiotic era. *Tropical animal health and production*, 53:1-16.
- EMA Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP) and EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Murphy, D. et al. 2017. EMA and EFSA Joint Scientific Opinion on measures to reduce the need to use antimicrobial agents in animal husbandry in the European Union, and the resulting impacts on food safety (RONAFA). *EFSA Journal*, 15(1):e04666.
- Ferronato, J. A. et al. 2018. Diagnosing mastitis in early lactation: use of Somaticell®, California mastitis test and somatic cell count. *Italian Journal of Animal Science*, 17(3):723-729.
- Flint DJ, Tonner E, Knight CH et al. 2001. Control of mammary involution by insulin-like growth factor binding proteins: Role of prolactin. *Livest Prod Sci*, 70(1-2):115-120.
- Forno-Bell, N., Muñoz, M. A., Chacón, O., Pachá, P., Iragüen, D., Cornejo, J., & San Martín, B. 2021. Efficacy prediction of four pharmaceutical formulations for intramammary administration containing *Aloe vera* (L.) Burm. f. combined with ceftiofur or cloxacillin in lactating cows as an alternative therapy to treat mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Veterinary Science*, 8:572568.
- Fredebeul-Krein, F. et al. 2022. Factors associated with the severity of clinical mastitis. *Pathogens*, 11(10):1089.
- Freeman ME, Kanyicska B, Learnt A, Gyorgy Nagy. 2000. Prolactin : Structure, Function, and Regulation of Secretion. *Physiol Rev*, 80(4):1523-1631.
- Fu, S. et al. 2022. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance of outbreaks of *Klebsiella pneumoniae* clinical mastitis in Chinese dairy farms. *Microbiology Spectrum*, 10(6):e02997-22.
- Fuenzalida, M. J., Fricke, P. M., & Ruegg, P. L. 2015. The association between occurrence and severity of subclinical and clinical mastitis on pregnancies per artificial insemination at first service of Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 98(6):3791-3805.
- Fukuyama, K. et al. 2020. Evaluation of the immunomodulatory ability of lactic acid bacteria isolated from feedlot cattle against mastitis using a bovine mammary epithelial cells in vitro assay. *Pathogens*, 9(5):410.
- Fuquay, J. W., McSweeney, P. L., Fox, P. F. 2011. *Encyclopedia of dairy sciences*. Academic Press.



- Galfi, A. L., Radinović, M. Ž., Davidov, I. N., Erdeljan, M. M., & Kovačević, Z. R. 2017. Detection of subclinical mastitis in dairy cows using California and Draminski mastitis test. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 33(4):465-473.
- Gao, J. et al. 2020. Impact of yeast and lactic acid bacteria on mastitis and milk microbiota composition of dairy cows. *AMB Express*, 10:1-12.
- García, P., Madera, C., Martínez, B., Rodríguez, A., Suárez, J. E. 2009. Prevalence of bacteriophages infecting *Staphylococcus aureus* in dairy samples and their potential as biocontrol agents. *Journal of dairy science*, 92(7):3019-3026.
- Ghai, S. et al. 2022. Allogenic umbilical cord blood-mesenchymal stem cells are more effective than antibiotics in alleviating subclinical mastitis in dairy cows. *Theriogenology*, 187:141-151.
- Goldammer T. et al. 2004. Mastitis increases mammary mRNA abundance of beta-defensin 5, toll-like-receptor 2 (TLR2), and TLR4 but not TLR9 in cattle. *Clin Diagn Lab Immunol*, 11(1):174–85.
- Gomes, F., Henriques, M. 2016. Control of bovine mastitis: old and recent therapeutic approaches. *Current microbiology*, 72:377-382.
- Gomes, F., Saavedra, M. J., Henriques, M. 2016. Bovine mastitis disease/pathogenicity: evidence of the potential role of microbial biofilms. *FEMS Pathogens and Disease*, 74(3):ftw006.
- Goulart, D. B., Mellata, M. 2022. *Escherichia coli* mastitis in dairy cattle: etiology, diagnosis, and treatment challenges. *Frontiers in Microbiology*, 13:928346.
- Griffioen, K., Cornelissen, J., Heuvelink, A., Adusei, D., Mevius, D., van der Wal, F. J., & 1Health4Food–Dutch Mastitis Diagnostics Consortium. 2020. Development and evaluation of 4 loop-mediated isothermal amplification assays to detect mastitis-causing bacteria in bovine milk samples. *Journal of dairy science*, 103(9):8407-8420.
- Griffioen, K., Hop, G. E., Holstege, M. M., Velthuis, A. G., Lam, T. J., & 1Health4Food–Dutch Mastitis Diagnostics Consortium. 2016. Dutch dairy farmers' need for microbiological mastitis diagnostics. *Journal of dairy science*, 99(7):5551-5561.
- Grinberg N. et al. 2008. Beta-hydroxybutyrate abrogates formation of bovine neutrophil extracellular traps and bactericidal activity against mammary pathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 76(6):2802–7.
- Gruet, P., Maincent, P., Berthelot, X., Kaltsatos, V. 2001. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Advanced drug delivery reviews*, 50(3):245-259.
- Guerra-Maupome, M., Slate, J. R., McGill, J. L. 2019. Gamma delta T cell function in ruminants. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 35(3):453-469.

- Guo, M. et al. 2021. Bacteriophage cocktails protect dairy cows against mastitis caused by drug resistant *Escherichia coli* infection. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11:690377.
- Guzmán-Luna, P., Nag, R., Martínez, I., Mauricio-Iglesias, M., Hospido, A., & Cummins, E. 2022. Quantifying current and future raw milk losses due to bovine mastitis on European dairy farms under climate change scenarios. *Science of the Total Environment*, 833:155149.
- Guzman, E., Hope, J., Taylor, G., Smith, A. L., Cubillos-Zapata, C., & Charleston, B. 2014. Bovine  $\gamma\delta$  T cells are a major regulatory T cell subset. *The Journal of Immunology*, 193(1):208-222.
- Hadsell DL, Bonnette SG, Lee A V. 2002. Genetic manipulation of the IGF-I axis to regulate mammary gland development and function. *J Dairy Sci*, 85(2):365-377.
- Hadsell DL, Parlow AF, Torres D, George J, Olea W. 2008. Enhancement of maternal lactation performance during prolonged lactation in the mouse by mouse GH and long-R3-IGF-I is linked to changes in mammary signaling and gene expression. *J Endocrinol*, 198(1):61-70.
- Hagnestam-Nielsen, C., Emanuelson, U., Berglund, B., Strandberg, E. 2009. Relationship between somatic cell count and milk yield in different stages of lactation. *Journal of Dairy Science*, 92(7):3124-3133.
- Halasa, T., Huijps, K., Østerås, O., & Hogeveen, H. 2007. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Veterinary quarterly*, 29(1):18-31.
- Halasa, T., Kirkeby, C. 2020. Differential somatic cell count: Value for udder health management. *Frontiers in veterinary science*, 7:609055.
- Han, S. et al. 2007. Therapeutic effects of honeybee (*Apis Mellifera* L.) venom injection on bovine mastitis. *Korean Journal of Veterinary Service*, 30(1):115-123.
- Hayes, B. J., Pryce, J., Chamberlain, A. J., Bowman, P. J., & Goddard, M. E. 2010. Genetic architecture of complex traits and accuracy of genomic prediction: coat colour, milk-fat percentage, and type in Holstein cattle as contrasting model traits. *PLoS genetics*, 6(9):e1001139.
- Heikkilä, A. M., Liski, E., Pyörälä, S., Taponen, S. 2018. Pathogen-specific production losses in bovine mastitis. *Journal of dairy science*, 101(10):9493-9504.
- Hein, W. R., & Mackay, C. R. 1991. Prominence of  $\gamma\delta$  T cells in the ruminant immune system. *Immunology today*, 12(1):30-34.
- Hiitö, H., Riva, R., Autio, T., Pohjanvirta, T., Holopainen, J., Pyörälä, S., & Pelkonen, S. 2015. Performance of a real-time PCR assay in routine bovine mastitis diagnostics compared with in-depth conventional culture. *Journal of Dairy Research*, 82(2):200-208.

- Hodgkinson AJ. et al. 2007. Adhesion molecule expression in the bovine mammary gland. *Vet Immunol Immunopathol*, 115(3–4):205–15.
- Hoek, A., Rutten, V. P., Kool, J., Arkesteijn, G. J., Bouwstra, R. J., Van Rhijn, I., & Koets, A. P. 2009. Subpopulations of bovine WC1+  $\gamma\delta$  T cells rather than CD4+ CD25highFoxp3+ T cells act as immune regulatory cells ex vivo. *Veterinary research*, 40(1).
- Hofírek, B., Dvořák, R., Němeček, L., Doležel, R., Pospíšil, Z. 2009. Nemoci skotu. *Česká buiatrická společnost, Brno*, 845-1001.
- Hogan, J. S., Galton, D. M., Harmon, R. J., Nickerson, S. C., Oliver, S. P., Pankey, J. W. 1990. Protocols for evaluating efficacy of postmilking teat dips. *Journal of dairy science*, 73(9):2580-2585.
- Hogan, J., & Smith, K. L. 2003. Coliform mastitis. *Veterinary research*, 34(5):507-519.
- Hogeveen, H., Steeneveld, W., Wolf, C. A. 2019. Production diseases reduce the efficiency of dairy production: A review of the results, methods, and approaches regarding the economics of mastitis. *Annual review of resource economics*, 11:289-312.
- Holko, I., Tančin, V., Vršková, M., Tvarožková, K. 2019. Prevalence and antimicrobial susceptibility of udder pathogens isolated from dairy cows in Slovakia. *Journal of Dairy Research*, 86(4):436-439.
- Hossain, M. K., Paul, S., Hossain, M. M., Islam, M. R., Alam, M. G. S. 2017. Bovine mastitis and its therapeutic strategy doing antibiotic sensitivity test. *Austin J. Vet. Sci. Anim. Husb*, 4(1):1030.
- Hovinen, M., Aisla, A. M., Pyörälä, S. 2006. Accuracy and reliability of mastitis detection with electrical conductivity and milk colour measurement in automatic milking. *Acta Agriculturae Scand Section A*, 56(3-4):121-127.
- Hovinen, M., Simojoki, H., Pösö, R., Suolaniemi, J., Kalmus, P., Suojala, L., & Pyörälä, S. 2016. N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase activity in cow milk as an indicator of mastitis. *Journal of dairy research*, 83(2):219-227.
- Hsu, H., Chen, C., Nenninger, A., Holz, L., Baldwin, C. L., & Telfer, J. C. 2015. WC1 is a hybrid  $\gamma\delta$  TCR coreceptor and pattern recognition receptor for pathogenic bacteria. *The Journal of Immunology*, 194(5):2280-2288.
- Huang, Y. Q., Morimoto, K., Hosoda, K., Yoshimura, Y., & Isobe, N. 2012. Differential immunolocalization between lingual antimicrobial peptide and lactoferrin in mammary gland of dairy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 145(1-2):499-504.
- Huijps, K., Lam, T. J., Hogeveen, H. 2008. Costs of mastitis: facts and perception. *Journal of dairy research*, 75(1):113-120.
- Hurley WL. *Lactation biology by University of Illinois, Urbana-Champaign*. 2010. 213.

- Chakraborty, S. et al. 2019. Technological interventions and advances in the diagnosis of intramammary infections in animals with emphasis on bovine population—a review. *Veterinary Quarterly*, 39(1):76-94.
- Chaneton, L., Sáez, J. P., Bussmann, L. E. 2011. Antimicrobial activity of bovine  $\beta$ -lactoglobulin against mastitis-causing bacteria. *Journal of dairy science*, 94(1):138-145.
- Chegini, A., Hossein-Zadeh, N. G., Hosseini-Moghadam, S. H., & Shadparvar, A. A. 2018. Genetic correlation estimates between milk production traits, mastitis and different measures of somatic cells in Holstein cows. *Animal production science*, 59(6):1031-1038.
- Chen, H., Weersink, A., Kelton, D., von Massow, M. 2021. Estimating milk loss based on somatic cell count at the cow and herd level. *Journal of Dairy Science*, 104(7):7919-7931.
- Chen, Q. et al. 2021. The protective effects of *Lactobacillus plantarum* KLDS 1.0344 on LPS-induced mastitis in vitro and in vivo. *Frontiers in Immunology*, 12:770822
- Cheng, W. N., Han, S. G. 2020. Bovine mastitis: Risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments—A review. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 33(11):1699.
- Cheng, W. N., Jeong, C. H., Kim, D. H., Han, S. G. 2020. Effects of moringa extract on adhesion and invasion of *Escherichia coli* O55 in bovine mammary epithelial cells. *Journal of dairy science*, 103(8):7416-7424.
- Iqbal, M., Amjed, M., Khan, M. A., Qureshi, M. S., Sadique, U. 2006. Comparative efficiency of some indirect diagnostic tests for the detection of sub-clinical mastitis in cows and buffaloes.
- Iraguha, B., Hamudikuwanda, H., & Mushonga, B. 2015. Bovine mastitis prevalence and associated risk factors in dairy cows in Nyagatare District, Rwanda. *Journal of the South African Veterinary Association*, 86(1):1-6.
- Ismail ZB. 2017. Mastitis vaccines in dairy cows: Recent developments and recommendations of application. *Vet World*, 10(9):1057–62.
- Jagielski, T. et al. 2019. A survey on the incidence of *Prototheca* mastitis in dairy herds in Lublin province, Poland. *Journal of dairy science*, 102(1):619-628.
- Jamali, H. et al. 2018. Invited review: Incidence, risk factors, and effects of clinical mastitis recurrence in dairy cows. *Journal of dairy science*, 101(6):4729-4746.
- Jones, G. M., & Bailey, T. L. 2006. Understanding the basics of mastitis. Virginia Cooperative Extension, Publication No. 404-233. Virginia State University, 1-7.
- Jungi TW. et al. 2001. Toll-like receptors in domestic animals. *Cell Tissue Res.*, 343(1):107–20.

- Kamiński, S., Cieślińska, A., Kostyra, E. 2007. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. *Journal of applied genetics*, 48:189-198.
- Kandeel, S. A., Megahed, A. A., Constable, P. D. 2019. Evaluation of hand-held sodium, potassium, calcium, and electrical conductivity meters for diagnosing subclinical mastitis and intramammary infection in dairy cattle. *Journal of veterinary internal medicine*, 33(5):2343-2353.
- Kandiwa, E., Iraguha, B., Mushonga, B., Hamudikuwanda, H., & Mpatwenumugabo, J. P. 2017. Comparison of cow-side diagnostic tests for subclinical mastitis of dairy cows in Musanze district, Rwanda. *Journal of the South African Veterinary Association*, 88(1):1-6.
- Karthikeyan, A., Radhika, G., Aravindakshan, T. V., Pruthviraj, D. R., & Pragathi, K. S. 2016. Genetic basis of mastitis resistance in cattle. *Int. J. Sci. Environ. Tech*, 5:2192-2199.
- Karzis, J., Donkin, E. F., Webb, E. C., Etter, E. M., Petzer, I. M. 2017. Somatic cell count thresholds in composite and quarter milk samples as indicator of bovine intramammary infection status. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 84(1):1-10.
- Kaskous, S. 2021. Physiological Aspects of milk somatic cell count in dairy cattle. *Int. J. Livest. Res*, 11:1-12.
- Kebede IA, Dahesa GD. 2024. Treatment and control methods of bovine mastitis: A review. *Vet Med Open J.*, 9(1): 7-14. DOI: 10.17140/VMOJ-9-182.
- Keefe, G. 2012. Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 28(2):203-216.
- Kelly, A. L., Leitner, G., Merin, U. 2018. Milk quality and udder health: Test methods and standards.
- Khangembam, R., Tóth, M., Vass, N., Várady, M., Czeglédi, L., Farkas, R., & Antonopoulos, A. 2021. Point of care colourimetric and lateral flow LAMP assay for the detection of *Haemonchus contortus* in ruminant faecal samples. *Parasite*, 28.
- Khatun, M., Thomson, P. C., García, S. C., Bruckmaier, R. M. 2022. Suitability of milk lactate dehydrogenase and serum albumin for pathogen-specific mastitis detection in automatic milking systems. *Journal of dairy science*, 105(3):2558-2571.
- Kibebew, K. 2017. Bovine mastitis: A review of causes and epidemiological point of view. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 7(2):1-14.
- Kibebew, K. 2017. Bovine mastitis: A review of causes and epidemiological point of view. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 7(2):1-14.
- Kim, S. M., Min, K. D., Yun, S. J., Hwang, D. Y., Kang, H. G. 2024. Therapeutic Dose, Duration, and Efficacy of Bee Venom for Treating Clinical Mastitis in Dairy Cow. *Journal of veterinary clinics*, 41(1):8-17.

- Kitazaki, K. et al. 2017. In vitro synergistic activities of cefazolin and nisin A against mastitis pathogens. *Journal of Veterinary Medical Science*, 79(9):1472-1479.
- Kitching, M. et al. 2019. A live bio-therapeutic for mastitis, containing *Lactococcus lactis* DPC3147 with comparable efficacy to antibiotic treatment. *Frontiers in microbiology*, 10:2220.
- Klaas, I. C., Zadoks, R. N. 2018. An update on environmental mastitis: Challenging perceptions. *Transboundary and emerging diseases*, 65:166-185.
- Knížková I., Kunc P. 2021. Infračervená Termografie: Specifika a správné postupy měření živých objektů. Výzkumný ústav živočišné výroby, v. v. i., Praha Uhřetěves. Dostupné z: <https://agronavigator.cz/sites/default/files/users/user291/Metodiky/Veterinární%20lekarstvi/Infračervená%20termografie%20%20Specifika%20a%20správné%20postupy%20měření%20živých%20objektů.pdf>
- Kober, A. H. et al. 2022. Immunomodulatory effects of probiotics: a novel preventive approach for the control of bovine mastitis. *Microorganisms*, 10(11):2255.
- Krömker, V., Leimbach, S. 2017. Mastitis treatment—Reduction in antibiotic usage in dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 52:21-29.
- Kumar H, Kawai T, Akira S. 2011. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol*, 30.
- Kumar, P. et al. 2020. Bovine mastitis: a review. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 28(6):497-507.
- Kurz, J. P., Yang, Z., Weiss, R. B., Wilson, D. J., Rood, K. A., Liu, G. E., & Wang, Z. 2019. A genome-wide association study for mastitis resistance in phenotypically well-characterized Holstein dairy cattle using a selective genotyping approach. *Immunogenetics*, 71:35-47.
- Kutilla, T., Pyörälä, S., Kaartinen, L., Isomäki, R., Vahtola, K., Myllykoski, L., & Saloniemi, H. 2003. Lactoferrin and Citrate Concentrations at Drying-off and During Early Mammary Involution of Dairy Cows. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 50(7):350-353.
- Lago, A., Godden, S. M., Bey, R., Ruegg, P. L., & Leslie, K. 2011. The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: I. Effects on antibiotic use, milk withholding time, and short-term clinical and bacteriological outcomes. *Journal of dairy science*, 94(9):4441-4456.
- Lago, A., Godden, S. M., Bey, R., Ruegg, P. L., & Leslie, K. 2011. The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: II. Effects on lactation performance, including clinical mastitis recurrence, somatic cell count, milk production, and cow survival. *Journal of dairy science*, 94(9):4457-4467.
- Lam, T. J., van Weeren, J. C., Sampimon, O. C., RG, O. R. 2011. On-farm udder health monitoring. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe G, Grosstiere/nutztiere*, 39(2):95-100.

- Lee JW. et al. 2006. Characterization of cytokine expression in milk somatic cells during intramammary infections with *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* by real-time PCR. *Vet Res*, 37(2):219–29.
- Lee, J. W., Paape, M. J., Elsasser, T. H., Zhao, X. 2003. Elevated milk soluble CD14 in bovine mammary glands challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Journal of Dairy Science*, 86(7):2382-2389.
- Lee, P. L. 2017. DNA amplification in the field: move over PCR, here comes LAMP.
- Leitner, G., Pinchasov, Y., Morag, E., Spanier, Y., Jacoby, S., Eliahu, D., Pitcovski, J. 2013. Immunotherapy of mastitis. *Veterinary immunology and immunopathology*, 153(3-4):209-216.
- Lewandowska-Sabat, A. M., Günther, J., Seyfert, H. M., & Olsaker, I. 2012. Combining quantitative trait loci and heterogeneous microarray data analyses reveals putative candidate pathways affecting mastitis in cattle. *Animal Genetics*, 43(6):793-799.
- Li, K. et al. 2022. *Lactobacillus plantarum* 17–5 attenuates *Escherichia coli*-induced inflammatory responses via inhibiting the activation of the NF- $\kappa$ B and MAPK signalling pathways in bovine mammary epithelial cells. *BMC Veterinary Research*, 18(1):250.
- Li, X., Xu, C., Liang, B., Kastelic, J. P., Han, B., Tong, X., & Gao, J. 2023. Alternatives to antibiotics for treatment of mastitis in dairy cows. *Frontiers in Veterinary Science*, 10:1160350.
- Li, Y., Zhu, Y., Chu, B., Liu, N., Chen, S., Wang, J. 2021. *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 prevents *Escherichia coli*-induced apoptosis through PINK1/Parkin-mediated mitophagy in bovine mastitis. *Frontiers in Immunology*, 12:715098.
- Liang Y, Zhou Y, Shen P. 2004. NF-kappaB and its regulation on the immune system. *Cell Mol Immunol*, 1(5):343–50.
- Libera, K., Konieczny, K., Witkowska, K., Żurek, K., Szumacher-Strabel, M., Cieslak, A., & Smulski, S. 2021. The association between selected dietary minerals and mastitis in dairy cows—A review. *Animals*, 11(8):2330.
- Lippolis JD. et al. 2006. Neutrophil extracellular trap formation by bovine neutrophils is not inhibited by milk. *Vet Immunol Immunopathol*, 113(1–2):248–55.
- Litwińczuk, Z., Król, J., Brodziak, A., Barłowska, J. 2011. Changes of protein content and its fractions in bovine milk from different breeds subject to somatic cell count. *Journal of dairy science*, 94(2):684-691.
- Liu, K. et al. 2022. The prevalence, molecular characterization and antimicrobial resistance profiling of *Streptococcus agalactiae* isolated from clinical mastitis cases on large dairy farms in China. *Journal of Dairy Research*, 89(1):75-79.

- Liu, M., Fang, G., Yin, S., Zhao, X., Zhang, C., Li, J., Liu, Z. 2019. Caffeic acid prevented LPS-induced injury of primary bovine mammary epithelial cells through inhibiting NF- $\kappa$ B and MAPK activation. *Mediators of Inflammation*.
- Lopes, T. S., Fontoura, P. S., Oliveira, A., Rizzo, F. A., Silveira, S., & Streck, A. F. 2020. Use of plant extracts and essential oils in the control of bovine mastitis. *Research in veterinary science*, 131:186-193.
- Luhar, R., Patel, R. K., Singh, K. M. 2006. Studies on the possible association of beta-lactoglobulin genotype with mastitis in dairy cows. *Indian journal of dairy science*, 59(3):155.
- Lundberg, Å., Nyman, A., Unnerstad, H. E., Waller, K. P. 2014. Prevalence of bacterial genotypes and outcome of bovine clinical mastitis due to *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis*. *Acta veterinaria scandinavica*, 56:1-11.
- Lysnyansky, I., & Ayling, R. D. 2016. *Mycoplasma bovis*: mechanisms of resistance and trends in antimicrobial susceptibility. *Frontiers in microbiology*, 7:81951.
- Maddox JF. et al. 1999. Increased neutrophil adherence and adhesion molecule mRNA expression in endothelial cells during selenium deficiency. *J Leukoc Biol*, 65(5):658–64.
- Mann, S., Sipka, A. S., Grenier, J. K. 2019. The degree of postpartum metabolic challenge in dairy cows is associated with peripheral blood mononuclear cell transcriptome changes of the innate immune system. *Developmental & Comparative Immunology*, 93:28-36.
- Manso, T., Lores, M., de Miguel, T. 2021. Antimicrobial activity of polyphenols and natural polyphenolic extracts on clinical isolates. *Antibiotics*, 11(1):46.
- Markusson, H. 2021. Total bacterial count as an attribute for raw milk quality.
- Martins, S. A. et al. 2019. Biosensors for on-farm diagnosis of mastitis. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7:186.
- Matsui, T. 2012. Vitamin C nutrition in cattle. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 25(5):597.
- Mattmiller SA, Carlson BA, Sordillo LM. 2013. Regulation of inflammation by selenium and selenoproteins: impact on eicosanoid biosynthesis. *J Nutr Sci*, 2:e28.
- McDougall, S. et al. 2016. Addition of meloxicam to the treatment of clinical mastitis improves subsequent reproductive performance. *Journal of Dairy Science*, 99(3):2026-2042.
- McDougall, S., Hussein, H., Petrovski, K. 2014. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysgalactiae* from dairy cows with mastitis. *New Zealand veterinary journal*, 62(2):68-76.



- McDougall, S., Williamson, J., Gohary, K., Lacy-Hulbert, J. 2021. Detecting intramammary infection at the end of lactation in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 104(9):10232-10249.
- McGill, J. L., Nonnecke, B. J., Lippolis, J. D., Reinhardt, T. A., & Sacco, R. E. 2013. Differential chemokine and cytokine production by neonatal bovine  $\gamma\delta$  T-cell subsets in response to viral toll-like receptor agonists and in vivo respiratory syncytial virus infection. *Immunology*, 139(2):227-244.
- McManus, R. et al. 2022. Thermography for disease detection in livestock: A scoping review. *Frontiers in veterinary science*, 9:965622.
- Milanov, D., Petrović, T., Polaček, V., Suvajdžić, L., & Bojkovski, J. 2016. Mastitis associated with *Prototheca zopfii*-an emerging health and economic problem on dairy farms. *Journal of Veterinary Research*, 60(4):373-378.
- Miura, A., Kurumisawa, T., Kano, R., Ito, T., Suzuki, K., Kamata, H. 2019. Next-generation sequencing analysis of bacterial flora in bovine protothecal mastitic milk and feces. *Journal of Veterinary Medical Science*, 81(11):1547-1551.
- Mohammadnezhad, M., Rahimi Mianji, G., & Farhadi, A. 2021. Identification of allelic variants of complement C4-A and Lactoferrin genes using iPLEX technique and its association with somatic cell count in Holstein cattle. *Animal Production*, 23(1):1-11.
- Mollenhorst, H., Rijkaart, L. J., Hogeveen, H. 2012. Mastitis alert preferences of farmers milking with automatic milking systems. *Journal of dairy science*, 95(5):2523-2530.
- Moreira, M. A., Júnior, A. S., Lima, M. C., da Costa, S. L. 2019. Infectious diseases in dairy cattle. In *Raw Milk* (pp. 235-258). Academic Press. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-810530-6.00011-0>
- Musayeva, K., Sederevicius, A., Zelvyte, R., Monkeviciene, I., Beliavska, A. D., & Garbenyte, Z. 2018. Lactoferrin and immunoglobulin g content in cow milk in relation to somatic cell count and number of lactations. *Veterinarija IR Zootechnika*, 76:98.
- Mushtaq, S., Shah, A. M., Shah, A., Lone, S. A., Hussain, A., Hassan, Q. P., & Ali, M. N. 2018. Bovine mastitis: An appraisal of its alternative herbal cure. *Microbial pathogenesis*, 114:357-361.
- Nale, J. Y., McEwan, N. R. 2023. Bacteriophage therapy to control bovine mastitis: A review. *Antibiotics*, 12(8):1307.
- Neculai-Valeanu, A. S., Ariton, A. M., Mădescu, B. M., Rîmbu, C. M., & Creangă, Ș. 2021. Nanomaterials and essential oils as candidates for developing novel treatment options for bovine mastitis. *Animals*, 11(6):1625.
- Neethirajan, S., Tuteja, S. K., Huang, S. T., Kelton, D. 2017. Recent advancement in biosensors technology for animal and livestock health management. *Biosensors and Bioelectronics*, 98:398-407.

- Nickerson SC, Sordillo LM. 2017. Modulation of the bovine mammary gland. 3rd edition. Champaign (IL): Large Dairy Herd Management, p. 907–19.
- Nickerson, Stephen & Akers, Robert. 2011. MAMMARY GLAND | Anatomy. DOI: 10.1016/B978-0-12-374407-4.00290-9.
- Odorčić, M., Rasmussen, M. D., Paulrud, C. O., Bruckmaier, R. M. 2019. Milking machine settings, teat condition and milking efficiency in dairy cows. *Animal*, 13(S1): s94-s99.
- Ogorevc, J., Kunej, T., Razpet, A., Dovc, P. 2009. Database of cattle candidate genes and genetic markers for milk production and mastitis. *Animal genetics*, 40(6):832-851.
- Ohnstad, I. 2012. Teat condition scoring as a management tool. *Livestock*, 17(7):34-40.
- Okkema, C., Grandin, T. 2021. Graduate Student Literature Review: Udder edema in dairy cattle—A possible emerging animal welfare issue. *Journal of Dairy Science*, 104(6):7334-7341.
- Paape MJ. et al. 2000. Immune surveillance of mammary tissue by phagocytic cells. *Adv Exp Med Biol*, 480:259–77.
- Pal, Prasanna & Grewal, Sonika & Ghosh, Satarupa & Sahu, Jyotimala & Aggarwal, Anjali. 2019. Role of hormones in persistency of lactation: A review. *JOURNAL OF ENTOMOLOGY AND ZOOLOGY STUDIES*. 7:677-683.
- Pandey, Y., Taluja, J. S., Vaish, R., Pandey, A., Gupta, N., & Kumar, D. 2018. Gross anatomical structure of the mammary gland in cow. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(4):728-733.
- Pant, S. D. et al. 2011. Bovine IFNGR2, IL12RB1, IL12RB2, and IL23R polymorphisms and MAP infection status. *Mammalian genome*, 22:583-588.
- Pantoja, J. C. F., Correia, L. B. N., Rossi, R. S., Latosinski, G. S. 2020. Association between teat-end hyperkeratosis and mastitis in dairy cows: A systematic review. *Journal of dairy science*, 103(2):1843-1855.
- Pascual-Garrigos, A. et al. 2021. On-farm colorimetric detection of *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, and *Histophilus somni* in crude bovine nasal samples. *Veterinary research*, 52:1-12.
- Paudyal, S., Melendez, P., Manriquez, D., Velasquez-Munoz, A., Pena, G., Roman-Muniz, I. N., Pinedo, P. J. 2020. Use of milk electrical conductivity for the differentiation of mastitis causing pathogens in Holstein cows. *animal*, 14(3):588-596.
- Pawlik, A., Sender, G., Kapera, M., Korwin-Kossakowska, A. 2015. Experimental immunology Association between interleukin 8 receptor  $\alpha$  gene (CXCR1) and mastitis in dairy cattle. *Central European Journal of Immunology*, 40(2):153-158.
- Peaker M, Wilde CJ. 1996. Feedback control of milk secretion from milk. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 1(3):307-315.

- Peralta, O. A. et al. 2020. Safety and efficacy of a mesenchymal stem cell intramammary therapy in dairy cows with experimentally induced *Staphylococcus aureus* clinical mastitis. *Scientific reports*, 10(1):2843.
- Pérez-Ibarreche, M., Field, D., Ross, R. P., Hill, C. 2021. A bioengineered nisin derivative to control *Streptococcus uberis* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(16):e00391-21.
- Petrovski, K. R., Trajcev, M., & Buneski, G. 2006. A review of the factors affecting the costs of bovine mastitis. *Journal of the South African Veterinary Association*, 77(2):52-60.
- Pezeshki A. et al. 2011. Variation of inflammatory dynamics and mediators in primiparous cows after intramammary challenge with *Escherichia coli*. *Vet Res*, 42(1):15.
- Pilla, R., Malvisi, M., Snel, G. G. M., Schwarz, D., König, S., Czerny, C. P., & Piccinini, R. 2013. Differential cell count as an alternative method to diagnose dairy cow mastitis. *Journal of Dairy Science*, 96(3):1653-1660.
- Pinzón-Sánchez, C., & Ruegg, P. L. 2011. Risk factors associated with short-term post-treatment outcomes of clinical mastitis. *Journal of dairy science*, 94(7):3397-3410.
- Podder, M. P., Rogers, L., Daley, P. K., Keefe, G. P., Whitney, H. G., Tahlan, K. 2014. *Klebsiella* species associated with bovine mastitis in Newfoundland. *PLoS one*, 9(9):e106518.
- Porcherie A. et al. 2012. Repertoire of *Escherichia coli* agonists sensed by innate immunity receptors of the bovine udder and mammary epithelial cells. *Vet Res*, 43(1):14.
- Porter, J., Anderson, J., Carter, L., Donjacour, E., Paros, M. 2016. In vitro evaluation of a novel bacteriophage cocktail as a preventative for bovine coliform mastitis. *Journal of dairy science*, 99(3):2053-2062.
- Prakash, V., Rathaur, A., Rai, D. C., Singh, S. J. 2022. Role of nanotechnology in mastitis treatment for dairy cows: a mini review: Nanotechnology in mastitis treatment. *Letters In Animal Biology*, 2(2):29-34.
- Pretorius, C. 2008. *The effect of Coryne bacterium cutis lysate to control somatic cell counts in dairy cows* (Doctoral dissertation, University of the Free State).
- Priyashantha, H. et al. 2021. Composition and properties of bovine milk: A study from dairy farms in northern Sweden; Part I. Effect of dairy farming system. *Journal of Dairy Science*, 104(8):8582-8594.
- Qiu, M. et al. 2022. Probiotic *Enterococcus mundtii* H81 inhibits the NF- $\kappa$ B signaling pathway to ameliorate *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in mice. *Microbial pathogenesis*, 164:105414.
- Qolbaini, E. N., Khoeri, M. M., Salsabila, K., Paramaiswari, W. T., Tafroji, W., Artika, I. M., & Safari, D. 2021. Identification and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant

Staphylococcus aureus-associated subclinical mastitis isolated from dairy cows in Bogor, Indonesia. *Veterinary World*, 14(5):1180.

Quinn, P. J. 1994. *Clinical veterinary microbiology*.

Radostits, O. M., Blood, D. C., & Gay, C. C. 1997. *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*.

Rainard P, Riollot C. 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet Res*, 37(3):369–400.

Rainard, P. 2017. Mammary microbiota of dairy ruminants: fact or fiction?. *Veterinary research*, 48(1):25.

Rainard, P., Foucras, G. 2018. A critical appraisal of probiotics for mastitis control. *Frontiers in veterinary science*, 5:251.

Rani, S., Singh, H., Ram, C. 2022. Efficacy and mechanism of carvacrol with octanoic acid against mastitis causing multi-drug-resistant pathogens. *Brazilian Journal of Microbiology*, 53(1):385-399.

Rani, S., Verma, S., Singh, H., Ram, C. 2022. Antibacterial activity and mechanism of essential oils in combination with medium-chain fatty acids against predominant bovine mastitis pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 74(6):959-969.

Rearte, R., Corva, S. G., de la Sota, R. L., Lacau-Mengido, I. M., Giuliodori, M. J. 2022. Associations of somatic cell count with milk yield and reproductive performance in grazing dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 105(7):6251-6260.

Regev, G., Martins, J., Sheridan, M. P., Leemhuis, J., Thompson, J., Miller, C. 2018. Feasibility and preliminary safety of nitric oxide releasing solution as a treatment for bovine mastitis. *Research in veterinary science*, 118:247-253.

Ren, G., Hu, D., Cheng, E. W., Vargas-Reus, M. A., Reip, P., & Allaker, R. P. 2009. Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *International journal of antimicrobial agents*, 33(6):587-590.

Ricciotti E, FitzGerald GA. 2011. Prostaglandins and Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31(5):986–1000.

Riservati DT. The Mammary Gland. *Dairy Knowledge*. 2009; 6:22-24.

Rivas, A. L., Quimby, F. W., Blue, J., Coksaygan, O. 2001. Longitudinal evaluation of bovine mammary gland health status by somatic cell counting, flow cytometry, and cytology. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 13(5):399-407.

Rivera Aguayo, P., Bruna Larenas, T., Alarcón Godoy, C., Cayupe Rivas, B., González-Casanova, J., Rojas-Gómez, D., & Caro Fuentes, N. 2020. Antimicrobial and antibiofilm capacity of chitosan nanoparticles against wild type strain of *Pseudomonas* sp. isolated from milk of cows diagnosed with bovine mastitis. *Antibiotics*, 9(9):551.

- Riveros-Galán, D. S., Obando-Chaves, M. 2021. Mastitis, somatic cell count, and its impact on the quality of dairy-products... An omission in Colombia?: A review. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 34(4):241-253.
- Roberson, J. R. 2012. Treatment of clinical mastitis. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 28(2):271-288.
- Robles, I., Kelton, D. F., Barkema, H. W., Keefe, G. P., Roy, J. P., Von Keyserlingk, M. A. G., DeVries, T. J. 2020. Bacterial concentrations in bedding and their association with dairy cow hygiene and milk quality. *Animal*, 14(5):1052-1066.
- Rogers, A. N., VanBuren, D. G., Hedblom, E. E., Tilahun, M. E., Telfer, J. C., & Baldwin, C. L. 2005.  $\gamma\delta$  T cell function varies with the expressed WC1 coreceptor. *The Journal of Immunology*, 174(6):3386-3393.
- Rose, S. G. S., Swinkels, J. M., Kremer, W. D., Kruitwagen, C. L., Zadoks, R. N. 2003. Effect of penethamate hydriodide treatment on bacteriological cure, somatic cell count and milk production of cows and quarters with chronic subclinical *Streptococcus uberis* or *Streptococcus dysgalactiae* infection. *Journal of Dairy Research*, 70(4):387-394.
- Rowe, S. et al. 2020. Evaluation of rapid culture, a predictive algorithm, esterase somatic cell count and lactate dehydrogenase to detect intramammary infection in quarters of dairy cows at dry-off. *Preventive veterinary medicine*, 179:104982.
- Ruegg, P. L. 2017. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *Journal of dairy science*, 100(12), 10381-10397.
- Ryman VE, Packiriswamy N, Sordillo LM. 2015. Role of endothelial cells in bovine mammary gland health and disease. *Anim Health Res Rev*, 16(2):135–49.
- Saidani, M. et al. 2018. Epidemiology, antimicrobial resistance, and extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in clinical bovine mastitis in Tunisia. *Microbial Drug Resistance*, 24(8):1242-1248.
- Santos, J. E. P., Cerri, R. L. A., Ballou, M. A., Higginbotham, G. E., Kirk, J. H. 2004. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. *Animal reproduction science*, 80(1-2):31-45.
- Sarita Pachauri, S. P., Puneet Varshney, P. V., Dash, S. K., & Gupta, M. K. 2013. Involvement of fungal species in bovine mastitis in and around Mathura, India.
- Sathiyabarathi, M. et al. 2016. Infrared thermography: A potential noninvasive tool to monitor udder health status in dairy cows. *Veterinary world*, 9(10):1075.
- Seegers, H., Fourichon, C., Beaudeau, F. 2003. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Veterinary research*, 34(5):475-491.
- Serhan CN, Chiang N. 2008. Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: a new pharmacologic genus. *Br J Pharmacol*, 153(Suppl 1): S200–15.

- Sevin, S., Karaca, B., Haliscelik, O., Kibar, H., OmerOglou, E., Kiran, F. 2021. Postbiotics secreted by *Lactobacillus sakei* EIR/CM-1 isolated from cow milk microbiota, display antibacterial and antibiofilm activity against ruminant mastitis-causing pathogens. *Italian Journal of Animal Science*, 20(1):1302-1316.
- Shah, P. et al. 2021. Synthetic antimicrobial peptide polybia MP-1 (Mastoparan) inhibits growth of antibiotic resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from mastitic cow milk. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 27(4):2471-2486.
- Shah, P. et al. 2022. Wasp venom peptide (Polybia MP-1) shows antimicrobial activity against multi drug resistant bacteria isolated from mastitic cow milk. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 28:1-14.
- Shahid, M. et al. 2020. *Prototheca zopfii* genotype II induces mitochondrial apoptosis in models of bovine mastitis. *Scientific Reports*, 10(1):698.
- Shan, Q., Liu, N., Wang, X., Zhu, Y., Yin, J., Wang, J. 2022. *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 attenuates foodborne *Bacillus cereus*-induced NLRP3 inflammasome activity in bovine mammary epithelial cells by protecting intercellular tight junctions. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 13(1):101.
- Sharma, N., Singh, N. K., Bhadwal, M. S. 2011. Relationship of somatic cell count and mastitis: An overview. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 24(3):429-438.
- Sharun, K. et al. 2021. Advances in therapeutic and managerial approaches of bovine mastitis: a comprehensive review. *Veterinary Quarterly*, 41(1):107-136.
- Sheet, O. H., Grabowski, N. T., Klein, G., Abdulmawjood, A. 2016. Development and validation of a loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis milk samples. *Molecular and cellular probes*, 30(5):320-325.
- Shimazaki, K. I., Kawai, K. 2017. Advances in lactoferrin research concerning bovine mastitis. *Biochemistry and Cell Biology*, 95(1):69-75.
- Schnitt, A., & Tenhagen, B. A. 2020. Risk factors for the occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy herds: An update. *Foodborne pathogens and disease*, 17(10):585-596
- Schreiner, D. A., Ruegg, P. L. 2003. Relationship between udder and leg hygiene scores and subclinical mastitis. *Journal of dairy science*, 86(11):3460-3465.
- Schukken, Y. et al. 2011. Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Veterinary immunology and immunopathology*, 144(3-4):270-289.
- Schukken, Y., Wilson, D., Welcome, F., Garrison-Tikofsky, L., & Gonzalez, R. 2003. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Veterinary research*, 34(5):579-596.

- Singh, A. K., Bhakat, C., Ghosh, M. K., Dutta, T. K. 2021. Technologies used at advanced dairy farms for optimizing the performance of dairy animals: A review. *Spanish journal of agricultural research*, 19(4):6.
- Singh, H., Gallier, S. 2017. Nature's complex emulsion: The fat globules of milk. *Food Hydrocolloids*, 68:81-89.
- Singh, U., Deb, R., Kumar, S., Singh, R., Sengar, G., & Sharma, A. 2015. Association of prolactin and beta-lactoglobulin genes with milk production traits and somatic cell count among Indian Frieswal (HF×Sahiwal) cows. *Biomarkers and genomic medicine*, 7(1):38-42.
- Smolenski GA. et al. 2015. Keratin and S100 calcium-binding proteins are major constituents of the bovine teat canal lining. *Vet Res.*, 46:113.
- Sommerhäuser, J., Kloppert, B., Wolter, W., Zschöck, M., Sobiraj, A., & Failing, K. 2003. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. *Veterinary microbiology*, 96(1):91-102.
- Sordillo LM, Mavangira V. 2014. The nexus between nutrient metabolism, oxidative stress and inflammation in transition cows. *Anim Prod Sci*, 54(9):1204–14.
- Sordillo LM, Peel JE. 1992. Effect of interferon-gamma on the production of tumor necrosis factor during acute *Escherichia coli* mastitis. *J Dairy Sci*, 75(8): 2119–25.
- Sordillo LM, Streicher KL. 2002. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 7(2):135–46.
- Sordillo LM. 2016. Nutritional strategies to optimize dairy cattle immunity. *J Dairy Sci*, 99(6):4967–82.
- Sordillo LM. 2018. Symposium review: Oxylipids and the regulation of bovine mammary inflammatory responses. *J Dairy Sci.*, 101(6):5629–41.
- Sordillo, L. M. 2018. Mammary gland immunobiology and resistance to mastitis. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 34(3):507-523.
- Sorensen A, Knight CH. 2002. Endocrine profiles of cows undergoing extended lactation in relation to the control of lactation persistency. *Domest Anim Endocrinol*, 23(1-2):111-123.
- Souza, R. F. S., Rault, L., Seyffert, N., Azevedo, V., Le Loir, Y., Even, S. 2018. *Lactobacillus casei* BL23 modulates the innate immune response in *Staphylococcus aureus*-stimulated bovine mammary epithelial cells. *Beneficial Microbes*, 9(6):985-995.
- Soyeurt, H. et al. 2012. Mid-infrared prediction of lactoferrin content in bovine milk: potential indicator of mastitis. *Animal*, 6(11):1830-1838.
- Spears JW, Weiss WP. 2008. Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. *Vet J*, 176(1):70–6.

- Srujana, A. S., Sonalika, J., Akhila, D. S., Juliet, M. R., Sheela, P. 2022. Isolation of phages and study of their in vitro efficacy on *Staphylococcus aureus* isolates originating from bovine subclinical mastitis. *Indian Journal of Animal Research*, 56(6):754-758.
- Stevens, M., Piepers, S., De Vliegher, S. 2016. Mastitis prevention and control practices and mastitis treatment strategies associated with the consumption of (critically important) antimicrobials on dairy herds in Flanders, Belgium. *Journal of Dairy Science*, 99(4):2896-2903.
- Summers C. et al. 2010. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* 31(8):318–24.
- Swami, S. V., Patil, R. A., & Gadekar, S. D. 2017. Studies on prevalence of subclinical mastitis in dairy animals. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(4):1297-1300.
- Tabas I, Glass CK. 2013. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. *Science*, 339(6116):166–72.
- Taifa, S. et al. 2022. Evaluation of therapeutic efficacy of copper nanoparticles in *Staphylococcus aureus*-induced rat mastitis model. *Journal of Nanomaterials*, p.1-12.
- Taponen, S., Salmikivi, L., Simojoki, H., Koskinen, M. T., Pyörälä, S. 2009. Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. *Journal of dairy science*, 92(6):2610-2617.
- Teijeira, Á. et al. 2020. CXCR1 and CXCR2 chemokine receptor agonists produced by tumors induce neutrophil extracellular traps that interfere with immune cytotoxicity. *Immunity*, 52(5):856-871.
- Teng, F. et al. 2022. Efficacy assessment of phage therapy in treating *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in mice. *Viruses*, 14(3):620.
- Tiwari, J. et al. 2013. Trends in therapeutic and prevention strategies for management of bovine mastitis: an overview. *Journal of Vaccines & Vaccination*, 4(1):1-11.
- Toghdory, A., Ghoorchi, T., Asadi, M., Bokharaeian, M., Najafi, M., & Ghassemi Nejad, J. 2022. Effects of environmental temperature and humidity on milk composition, microbial load, and somatic cells in milk of Holstein dairy cows in the northeast regions of Iran. *Animals*, 12(18):2484.
- Tomanić, D. et al. 2022. Environmental bovine mastitis pathogens: prevalence, antimicrobial susceptibility, and sensitivity to *Thymus vulgaris* L., *Thymus serpyllum* L., and *Origanum vulgare* L. essential oils. *Antibiotics*, 11(8):1077.
- Tomazi, T., de Souza Filho, A. F., Heinemann, M. B., Santos, M. V. D. 2018. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility pattern of *Streptococcus agalactiae* isolated from clinical mastitis in dairy cattle. *PloS one*, 13(6):e0199561.



- Tonner E, Quarrie L, Travers M et al. 1995. Does an IGF-binding protein (IGFBP) present in involuting rat mammary gland regulate apoptosis? *Prog Growth Factor Res*, 6(2-4):409-414.
- Touza-Otero, L., Landin, M., Diaz-Rodriguez, P. 2024. Fighting antibiotic resistance in the local management of bovine mastitis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 170:115967.
- Tucker HA. 2010. Hormones, Mammary Growth, and Lactation: a 41-Year Perspective. *J Dairy Sci*, 83(4):874-884.
- Vakkamäki, J., Taponen, S., Heikkilä, A. M., Pyörälä, S. 2017. Bacteriological etiology and treatment of mastitis in Finnish dairy herds. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 59:1-9.
- Valeeva, N. I., Lam, T. J. G. M., Hogeveen, H. 2007. Motivation of dairy farmers to improve mastitis management. *Journal of Dairy Science*, 90(9):4466-4477.
- Vander Elst, N., Meyer, E. 2018. Potential therapeutic application of bacteriophages and phage-derived endolysins as alternative treatment of bovine mastitis. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 87(4):181-187.
- Védrine, M. et al. 2018. Sensing of Escherichia coli and LPS by mammary epithelial cells is modulated by O-antigen chain and CD14. *PLoS One*, 13(8):e0202664.
- Viguiet, C., Arora, S., Gilmartin, N., Welbeck, K., O’Kennedy, R. 2009. Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends in biotechnology*, 27(8):486-493.
- Villarroel, A., Dargatz, D. A., Lane, V. M., McCluskey, B. J., & Salman, M. D. 2007. Suggested outline of potential critical control points for biosecurity and biocontainment on large dairy farms. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 230(6):808-819.
- Vitali, A. et al. 2020. Heat load increases the risk of clinical mastitis in dairy cattle. *Journal of dairy science*, 103(9):8378-8387.
- Wall, R., Powell, A., Sohn, E., Foster-Frey, J., Bannerman, D., & Paape, M. 2009. Enhanced host immune recognition of mastitis causing Escherichia coli in CD-14 transgenic mice. *Animal biotechnology*, 20(1):1-14.
- Wallis, J. K., Krömker, V., & Paduch, J. H. 2018. Biofilm formation and adhesion to bovine udder epithelium of potentially probiotic lactic acid bacteria. *AIMS microbiology*, 4(2):209.
- Wang, F., Herzig, C. T., Chen, C., Hsu, H., Baldwin, C. L., & Telfer, J. C. 2011. Scavenger receptor WC1 contributes to the  $\gamma\delta$  T cell response to Leptospira. *Molecular Immunology*, 48(6-7):801-809.
- Wang, M., Wang, T., Guan, Y., Wang, F., Zhu, J. 2019. The preparation and therapeutic roles of scFv-Fc antibody against Staphylococcus aureus infection to control bovine mastitis. *Applied microbiology and biotechnology*, 103:1703-1712.

- Wang, Y., Zarlenga, D. S., Paape, M. J. 2006. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. US 6,984,503.
- Wang, Z. et al. 2021. Phage vB\_PaeS-PAJD-1 rescues murine mastitis infected with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11:689770.
- Weigel, K. A., Shook, G. E. 2018. Genetic selection for mastitis resistance. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 34(3):457-472.
- Wellnitz, O., Bruckmaier, R. M. 2012. The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. *The veterinary journal*, 192(2):148-152.
- Wentao, M. A. et al. 2019. Development of a monoclonal antibody against bovine  $\alpha$ -casein to evaluate functional status of mammary epithelial cells during mastitis. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 25(4).
- Wipf, J. R., Schwendener, S., Perreten, V. 2014. The novel macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance gene *erm* (44) is associated with a prophage in *Staphylococcus xylosus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(10):6133-6138.
- Wu, Z., Zhang, Z., Lei, Z., Lei, P. 2019. CD14: Biology and role in the pathogenesis of disease. *Cytokine & growth factor reviews*, 48:24-31.
- Xi, H. et al. 2020. Bacteriophage protects against *Aerococcus viridans* infection in a murine mastitis model. *Frontiers in Veterinary Science*, 7:588.
- Xu, T., Zhu, H., Chang, G., Yang, Y., Yang, Z. 2022. The protective role of caffeic acid on bovine mammary epithelial cells and the inhibition of growth and biofilm formation of Gram-negative bacteria isolated from clinical mastitis milk. *Frontiers in Immunology*, 13:1005430.
- Yusuf, B., Abraha, B., Salih, K., Abdurahman, A., Alemu, S., Wondimu, A., & Bayu, Y. 2022. In vitro Antibacterial Evaluation of Four Selected Medicinal Plants against *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis in Mieso District West Hararghe Zone, Oromia Regional State, Ethiopia. *Open Microbiol. J.*, 16(1).
- Zaatout, N. 2022. An overview on mastitis-associated *Escherichia coli*: pathogenicity, host immunity and the use of alternative therapies. *Microbiological research*, 256:126960.
- Zadoks, R. N., Middleton, J. R., McDougall, S., Katholm, J., Schukken, Y. H. 2011. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 16:357-372.
- Zaragoza, C. S., Olivares, R. A. C., Watty, A. E. D., de la Peña Moctezuma, A., & Tanaca, L. V. 2011. Yeasts isolation from bovine mammary glands under different mastitis status in the Mexican High Plateau. *Revista iberoamericana de micologia*, 28(2):79-82.

- Zhang, S. et al. Z. 2018. Bee venom therapy: Potential mechanisms and therapeutic applications. *Toxicon*, **148**:64-73.
- Zheng, Z., Gorden, P. J., Xia, X., Zheng, Y., Li, G. 2022. Whole-genome analysis of *Klebsiella pneumoniae* from bovine mastitis milk in the US. *Environmental Microbiology*, **24**(3):1183-1199.
- Zi, C., Zeng, D., Ling, N., Dai, J., Xue, F., Jiang, Y., & Li, B. 2018. An improved assay for rapid detection of viable *Staphylococcus aureus* cells by incorporating surfactant and PMA treatments in qPCR. *BMC microbiology*, **18**:1-8.
- Zigo, F., Vasil', M., Ondrašovičová, S., Výrostková, J., Bujok, J., Pecka-Kielb, E. 2021. Maintaining optimal mammary gland health and prevention of mastitis. *Frontiers in veterinary science*, **8**:607311.
- Zouharova, M., Rysanek, D. 2008. Multiplex PCR and RPLA identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains from bulk tank milk. *Zoonoses and Public health*, **55**(6):313-319.

## 13 Seznam použitých zkratek a symbolů

AMR - antimikrobiální rezistence  
B-lymfocyty - B-buňky  
CFU - colony forming units  
CMT – Kalifornský test (NK test)  
CNS – Coagulase-Negative Staphylococci  
COX – cyklooxygenáza  
CSFs - colony-stimulating factors  
CSN1S1 - gen kódující  $\alpha$ -S1-casein  
CSN1S2 – gen kódující  $\alpha$ -S2-casein  
CSN2 – gen kódující  $\beta$ -casein  
CSN3 – gen kódující  $\kappa$ -casein („kappa-casein“)  
CXCR1 - C-X-C motif chemokine receptor 1  
DNA – deoxyribonukleová kyselina  
FIL - feedback inhibitor of lactation  
G-CSF - granulocyte colony-stimulating factor  
IFN- $\gamma$  - interferon gamma  
IFN- $\gamma$  – interferon gama  
IFNGR2 - interferon-gama receptor 2  
IFNs – interferony  
Ig – imunoglobulin  
IgA - imunoglobulin A  
IGF - insulin-like growth factor  
IGF-1 - insulin-like growth factor type 1  
IGFBP - insulin-like growth factor-binding protein  
IgG - imunoglobulin G  
IgG1 - imunoglobulin podtřída 1 v séru  
IgG2 - imunoglobulin podtřída 2 v séru  
IgM - imunoglobulin M  
IL-1 - interleukin 1  
IL-10 – interleukin 10  
IL-17 – interleukin 17  
IL-17 – interleukin 17

IL-1 $\beta$  - interleukin-1 beta  
IL-2 - interleukin 2  
IL-4 – interleukin 4  
IL-8 - interleukin 8  
ILs – interleukiny  
IMM – intramamární  
*In vitro* – „ve zkumavce“  
*In vivo* – „v živém organismu“  
KRT5 - keratin 5  
LAB - bakterie mléčného kvašení (lactic acid bacteria)  
LAMP – loop-mediated isothermal amplification  
LDH - laktát dehydrogenáza  
LOX – lipoxygenáza  
LPS – lipopolysacharidy  
LPS/rbosCD14 - LPS with recombinant bovine soluble  
LTF – laktoferin  
LX – lipoxiny  
MAC-T - mamární bovinní epiteliální buňky (bovine mammary epithelial cells)  
MAR - multiple antibiotic resistance  
MHC - hlavní histokompatibilní komplex  
MSC – mesenchymal stem cells  
NAGázy - N-acetyl-beta-delta glukosaminidázy  
NET - neutrofilní extracelulární pasti  
NF- $\kappa$ B - nukleární faktor kappa B  
NF- $\kappa$ Bm - mutant „nukleárního faktoru kappa B“  
NGS – next generation sequencing  
NK – „natural killer“ buňky  
PAMPs - pathogen-associated molecular patterns  
PCR - polymerázová řetězová reakce  
PEGylovaného bovinního G-CSF - pegbovigrastim = modifikovaná forma přirozeně se vyskytujícího imunoregulačního cytokinu  
PGD2 - prostaglandin D2  
PGE2 - prostaglandin E2  
pH - potential of hydrogen

Pomocné T-lymfocyty - T<sub>h</sub>-buňky  
PRR receptory - pattern recognition receptors  
QTL - quantitative trait locus  
ROS - reactive oxygen species  
SA - sérový albumin  
SCC – počet somatických buněk (somatic cell count) v 1 mililitru mléka  
SNP - single-nucleotide polymorphism  
SORCS3 - sortilin related VPS10 domain containing receptor 3  
STH - růstový hormon somatotropin  
T-lymfocyty - T-buňky  
TBC – celkový počet bakterií (total bacterial count)  
TGF-β – transforming growth factor beta  
TLR-2 - Toll-like receptor 2  
TLR-4 - Toll-like receptor 4  
TLRs - Toll-like receptors  
TNF-α - TNF-alfa faktor  
TNFs - tumor necrosis factors  
TRH - thyroid releasing hormon  
WC1 - transmembrane glycoprotein workshop cluster 1  
αβ T-lymfocyty – alfa/beta T buňky  
β-LG - beta-laktoglobulin  
γδ T-lymfocyty - gama delta T buňky