

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Zdraví mléčné žlázy a možnosti detekce patogenních
mikroorganismů v kravském mléce**

Bakalářská práce

Autor práce: Veronika Ryšavá

Obor studia: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: Ing. Kateřina Jochová, Ph.D.

Konzultant: Ing. Ladislav Tichý

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Zdraví mléčné žlázy a možnosti detekce patogenních mikroorganismů v kravském mléce" 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 3. 5. 2021

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Kateřině Jochové, Ph.D. za odborné vedení, pomoc a trpělivost při zpracování této bakalářské práce. Za cenné rady děkuji také Ing. Ladislavu Tichému. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině za veškerou podporu během studia.

Zdraví mléčné žlázy a možnosti detekce patogenních mikroorganismů v kravském mléce

Souhrn

Snaha o neustálé zvyšování dojivosti krav je v literatuře spojována se zvyšujícím se rizikem výskytu mastitidy. Jedná se o zánětlivé onemocnění mléčné žlázy, které snižuje kvalitu mléka a má značný vliv na následný pokles dojivosti. Zánět může způsobit přes 130 patogenních mikroorganismů. Nejčastějšími jsou však *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus uberis*.

Mastitida se rozlišuje dle závažnosti infekce a jejich projevů na klinickou a subklinickou. Klinická mastitida je doprovázena zarudnutím, otokem vemene a senzoryckými změnami mléka. Závažnějším problémem je ale mastitida subklinická, protože infekce není doprovázena žádnými zjevnými projevy. Může se tak nejen snadněji šířit mezi dojnicemi, ale také se mléko infikovaných krav může dostávat do potravinového řetězce. Konzumace tohoto mléka nese určitá rizika, v podobě přenosu řady onemocnění. Některé kmeny rodu *Staphylococcus aureus* mohou produkovat enterotoxiny, které zapříčiňují nevolnost, zvracení a ve vážných případech mohou způsobit syndrom toxického šoku.

Včasná identifikace patogenních mikroorganismů je klíčovým bodem nejen při rychlé a účinné léčbě dojnic, ale také pro snížení rizika kontaminace mléka a mléčných výrobků. Pro jejich identifikaci bylo vyvinuto hned několik typů metod, jako jsou stájové a imunologické testy, mikrobiální kultivace, či genetická charakterizace. Tyto metody se v průběhu času vyvinuly od nejjednodušších, a taky méně specifických způsobů, až po velmi sofistikované jako jsou právě molekulárně genetické metody. Ty mají potenciál rychlé a citlivé identifikace patogenních mikroorganismů nejen v kravském mléce.

Polymerázová řetězová reakce je založena na amplifikaci DNA patogenů v mléce. Výsledky jsou poté vyhodnoceny pomocí elektroforézy. Speciální modifikací této metody je kvantitativní real-time PCR, která umožňuje sledovat nárůst množství DNA v reálném čase, a to díky fluorescenčnímu substrátu, který se váže na přítomnou nukleovou kyselinu. Hladina navázaného substrátu je detekována a odráží množství přítomné DNA. Kromě detekce patogenů by se tato metoda mohla v budoucnu běžně využívat pro zjištění přítomnosti genů, které zodpovídají za rezistenci vůči antibiotikům.

Na základě vědeckých studií byl vypracován podrobný přehled zaměřující se na možnosti detekce patogenních mikroorganismů v mléce s důrazem na molekulárně genetické metody.

Klíčová slova: mastitis; polymerázová řetězová reakce; kvantifikace; identifikace; diagnostika

Udder health and microorganism detection strategies in milk

Summary

The efforts to constantly increasing the milk yield of cows could result in an increased risk of mastitis. It is an inflammatory disease of the mammary gland, which reduces the quality of milk and has a significant effect on the consequent decrease in milk yield. Inflammation can be caused by over 130 pathogenic microorganisms. However, the most common are *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis*.

Mastitis is divided according to the severity of the infection and their manifestations into clinical and subclinical. Clinical mastitis is accompanied by redness, swelling of the udder and sensory changes in the milk. However, subclinical mastitis is a more serious problem because the infection is not accompanied by any obvious manifestations. It can spread more easily between dairy cows and also the milk of infected cows can enter the food chain. Consumption of this milk carries certain risks, such as the transmission of many diseases. Some strains of the genus *Staphylococcus aureus* can produce enterotoxins that cause nausea, vomiting and in severe cases it can cause toxic shock syndrome.

Early identification of pathogenic microorganisms is a key point not only in the rapid and effective treatment of dairy cows, but also in reducing the risk of contamination of milk and dairy products. Several types of methods have been developed for their identification, such as on farm-tests and immunological tests, microbial cultivation or genetic characterisation. Over time, these methods have evolved from the simplest, and also less specific, methods to very sophisticated methods such as molecular genetic methods. These have the potential for rapid and sensitive identification of pathogenic microorganisms not only in cow's milk.

The polymerase chain reaction is based on the amplification of DNA pathogens in milk. The results are then evaluated by electrophoresis. A special modification of this method is quantitative real-time PCR, which allows to monitor the increase in the amount of DNA in real time, thanks to the fluorescent substrate, which binds to the presented nucleic acid. The level of bound substrate is detected and reflects the amount of DNA present. In addition to detecting pathogens, this method could be commonly used in the future to detect the presence of genes responsible for antibiotic resistance.

Based on scientific studies, a detailed overview was prepared focusing on the possibilities of detecting pathogenic microorganisms in milk with emphasis on molecular genetic methods.

Keywords: mastitis; polymerase chain reaction; quantification; identification; diagnostic

Obsah

1	Úvod.....	7
2	Cíl práce.....	8
3	Literární rešerše.....	9
3.1	Mastitida.....	9
3.1.1	Klinická mastitida.....	10
3.1.2	Subklinická mastitida.....	10
3.2	Ekonomické aspekty mastitidy.....	11
3.3	Prevence.....	12
3.4	Legislativní požadavky na syrové mléko a dojení.....	13
3.5	Patogenní mikroorganismy.....	14
3.5.1	Streptokokové mastitidy.....	15
3.5.2	Stafylokokové mastitidy.....	16
3.5.3	Koliformní mastitidy.....	16
3.5.4	Mykoplazmatické mastitidy.....	17
3.6	Riziko konzumace kontaminovaného mléka.....	18
3.7	Diagnostika mastitidy.....	19
3.7.1	Kalifornský test mastitidy.....	21
3.7.2	Kultivace bakterií.....	22
3.7.3	Počet somatických buněk.....	22
3.7.4	Elektrická vodivost.....	23
3.7.5	ELISA.....	23
3.7.6	MALDI-TOF MS.....	25
3.8	Molekulárně genetické metody.....	25
3.8.1	Izolace nukleových kyselin.....	26
3.8.2	Stanovení koncentrace DNA.....	27
3.8.3	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	28
3.8.4	Gelová elektroforéza.....	29
3.8.5	Real-time PCR (qPCR).....	30
3.8.6	Částečné sekvenování 16S rRNA.....	33
3.8.7	DNA čipy a hybridizace.....	35
3.9	Srovnání kultivačních a molekulárně genetických metod.....	36
4	Závěr... ..	37
5	Seznam použité literatury.....	38

1 Úvod

Mléko a mléčné výrobky jsou významnými zdroji živin lidské výživy. Rostoucí poptávka po mléčných výrobcích vede ke snaze zvyšování doживosti krav. Toho bylo docíleno především šlechtěním zvířat, zlepšením výživy a ustájení. Extrémní zvyšování doживosti krav však má negativní vliv na jejich zdraví. Řada studií spojuje právě vysokou doживost s častějším výskytem mastitidy. Mastitida je v současné době ekonomicky nejnáročnějším onemocněním dojeného skotu, které dopadá i na mlékárenský průmysl. Navzdory tomu jsou náklady na toto onemocnění velmi podceňované. Nejenže má značný vliv na snížení kvality mléka, ale také způsobuje snížení celkové produkce mléka až o 15 % z celkové laktace. Ekonomické ztráty jsou také způsobeny vyřazením mléka z dodávky pro lidskou spotřebu po dobu ochranné lhůty při podání antibiotik.

Mastitida je zánět parenchymu mléčné žlázy, který je charakterizovaný fyzikálními, chemickými a bakteriálními změnami mléka. V případě klinické mastitidy jsou nejčastějšími příznaky zarudnutí, otok vemene a sensorické změny mléka. Nicméně výraznějším problémem je mastitida subklinická. Důvodem je, že se na první dojem neprojevuje změnami mléka ani vemene. Na každou dojnici postiženou klinickou mastitidou totiž připadá 20-40 případů subklinické mastitidy. Patogenů způsobujících mastitidu je celá řada. Nejčastějšími původci jsou bakterie rodu *Streptococcus* a *Staphylococcus*. Dle způsobu přenosu se pak rozlišují mastitidy kontagiózní neboli infekční a environmentální.

Při zjištění mastitidy jsou většinou ihned nasazena antibiotika. Jejich časté podávání však může vést k rezistenci na tato léčiva. Proto je důležité se zaměřit na včasnou a přesnou diagnostiku subklinické mastitidy, která může vzniku rezistence předcházet. Existuje řada stájových testů, které jsou nenáročné a finančně dostupné. Za zlatý standard diagnostiky mastitid se považuje mikrobiální kultivace. Zatím má ale každá metoda svá úskalí.

V posledních letech je častěji využíván obrovský potenciál molekulárně genetických metod, které hrají v diagnostice, nejen mastitidních patogenů, významnou roli. Právě metoda polymerázové řetězové reakce a některé její modifikace přinášejí řadu benefitů, které by mohly v budoucnu znamenat nahrazení dosavadních metod. Jejich hlavní výhodou je vysoká citlivost, rychlost a specifita. V praxi to znamená, že je možné získat výsledky již během několika hodin.

2 Cíl práce

Mastitida je jedním z nejčastějších onemocnění v chovu skotu. Mléčné produkty mají potenciál přenášet patogeny z nekvalitního mléka do lidské populace. Včasná a přesná identifikace patogenních mikroorganismů pomáhá tedy nejen rychle a účinně léčit dojnice, ale také snižovat riziko kontaminace potravin a mléka určeného pro lidskou spotřebu. Cílem práce je přinést komplexní literární přehled možností kvantifikace a identifikace mikroorganismů v kravském mléce s důrazem na molekulárně genetické metody.

3 Literární řešerše

3.1 Mastitida

Mastitida je zánětlivé onemocnění vemene, při kterém dochází k narušení zdravé mléčné žlázy. Toto onemocnění může mít infekční nebo neinfekční etiologii, což závisí hlavně na patogenu, který daný zánět vyvolal (Bradley 2002). Je známo, že mastitidu způsobuje přibližně 130 druhů mikroorganismů včetně bakterií, kvasinek a řas (Mushtaq et al. 2018). V mnoha zemích je mastitida nejčastějším a nákladným infekčním onemocněním vyskytujícím se v chovech dojnic. Kromě negativního dopadu na efektivitu a kvalitu produkce je mastitida významným problémem v oblasti zdraví a dobrých životních podmínek (Tančin & Tančinová 2008) a může vést i ke snížení plodnosti dojnic (Pinedo et al. 2020). Propuknutí mastitidy může ovlivnit stres, stáří zvířete, pořadí laktace a její stádium, anatomické dispozice či imunologický stav (Zigo et al. 2021). Gáspárdy et al. (2012) uvádějí, že vysokoužitkové dojnice jsou mnohem citlivější na infekci vemene. Významným ukazatelem prevalence je tělesná kondice. Dojnice s nízkou tělesnou kondicí mají vyšší riziko v propuknutí mastitidy (Fufa et al. 2013). Bakterie převážně napadají strukový kanálek, přes který se dostanou do vemene, kde se množí a produkují toxiny (Tančin & Tančinová 2008).

Kromě laminitidy a metritidy je mastitida také často uváděna jako jedna z hlavních produkčních nemocí (Zigo et al. 2021). Všechna tato onemocnění jsou zánětlivá, avšak každá zasahují jinou část těla. Laminitida postihuje škrky paznehtů, což má za následek kulhání. Postižené zvíře trpí viditelnými vředy a krvácením (Ding et al. 2020). U metritidy se jedná o zánětlivé onemocnění dělohy, které propukne po porodu (Wiebe et al. 2021).

Negativní vliv mastitid se projevuje nejen na technologických vlastnostech mléka, ale právě i na jeho výživové hodnotě (tabulka č. 1) a bezpečnosti pro konzumenta (Kester et al. 2015). Dochází ke snížení obsahu vápníku, fosforu, laktózy a tuku (Tančin & Tančinová 2008) a naopak ke zvýšení obsahu syrovátkových bílkovin (Wang et al. 2021), sodíku a chloru (Tančin & Tančinová 2008).

V návaznosti na závažnosti infekce a jejich projevů rozdělujeme mastitidu na klinickou a subklinickou.

Tabulka č. 1 Porovnání složení normálního mléka a mléka se zvýšeným počtem somatických buněk (PSB) (Tančin & Tančinová 2008)

Složka	Mléko od zdravé dojnice (%)	Mléko s vysokým PSB (%)
Tuk	3,5	3,2
Laktóza	4,9	4,4
Kasein	2,8	2,3
Syrovátkové bílkoviny	0,8	1,3
Imunoglobuliny	0,1	0,6
Sodík	0,057	0,105
Chlor	0,091	0,147
Draslík	0,173	0,157
Vápník	0,12	0,04

3.1.1 Klinická mastitida

Klinická forma se projevuje znatelnými změnami ve vzhledu a fyzikálně-chemickém složení mléka, zvýšením počtu somatických buněk a lézemi v mléčné žláze (Kaczorek-Łukowska et al. 2021). Hlavním příznakem je zvýšený počet somatických buněk (PSB) v mléce doprovázený zarudnutím a bolestivostí vemene. Mění se také sensorické vlastnosti mléka (Zavadilová 2017) a mohou se v něm objevovat sraženiny, vločky, popřípadě krev (Tezera & Aman Ali 2021). Jako léčivo se používají antibiotika, což v důsledku vede k vyřazení mléka z dodávky pro lidskou spotřebu po dobu léčení a trvání ochranné lhůty. V mnoha případech je možné i určit specifického původce zánětu (Zavadilová 2017). Nedávné studie zjistily, že dojnice s klinickou mastitidou měly sníženou pravděpodobnost zabřeznutí ve srovnání se zdravými krávami (Villa-Arcila et al. 2017), a to až o 50 %, v případě mastitidy způsobené bakteriemi *E. coli* a *Streptococcus spp.* (Hertl et al. 2010).

3.1.2 Subklinická mastitida

Tento typ mastitidy je velmi těžké detekovat. Její výskyt je častější u starších zvířat, na která má vážný dopad (Abebe et al. 2016). Nejenže má poměrně dlouhou inkubační dobu (Wang et al. 2021), ale také na rozdíl od klinické mastitidy, nemá subklinický typ žádné viditelné symptomy. Subklinická forma převládá nad klinickou (Tezera & Aman Ali 2021). Dojnice nemá zarudlé vemeno a mléko má stejné sensorické vlastnosti jako u zdravé dojnice. Hlavním ukazatelem je zvýšený PSB (Ashraf & Imran 2018), podle kterého lze mastitidu identifikovat (Persson Waller et al. 2021). Mléko od dojnice postižené subklinickou mastitidou má snížený obsah mléčného tuku, bílkovin, laktózy, draslíku, vápníku, magnézia, fosforu, železa a zinku, a naopak zvýšené pH (Ashraf & Imran 2018). Také dochází k výraznějšímu snížení produkce, než je tomu u klinické mastitidy (Tančin & Tančinová 2008). Při vyšším PSB dochází k výraznějšímu znehodnocení mléka. Proto je důležité, zaměřit se na včasnou detekci tohoto typu onemocnění, čímž můžeme významně ovlivnit výskyt klinických případů. Dojnice postižené subklinickou mastitidou představují nebezpečný zdroj mikroorganismů pro zdravá vemena ostatních krav v chovu (Tančin & Tančinová 2008). Pokud nedošlo k bakteriologickému vyléčení, přecházejí klinické případy v subklinickou mastitidu a zárodky dále přežívají v tkáni mléčné žlázy (Bouška et al. 2006).

Dále rozlišujeme mastitidu latentní a aseptickou. V případě latentní mastitidy je PSB menší než 400 tis./ml, ale byla u této dojnice potvrzena přítomnost patogenních mikroorganismů. Naopak u aseptické mastitidy je PSB mnohem vyšší než 400 tis./ml, ale nebyl zde identifikován žádný patogen (Galal Abdel Hameed et al. 2007). Porovnání jednotlivých typů mastitid je znázorněno v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2 Srovnání PSB u jednotlivých typů mastitid (Galal Abdel Hameed et al. 2007)

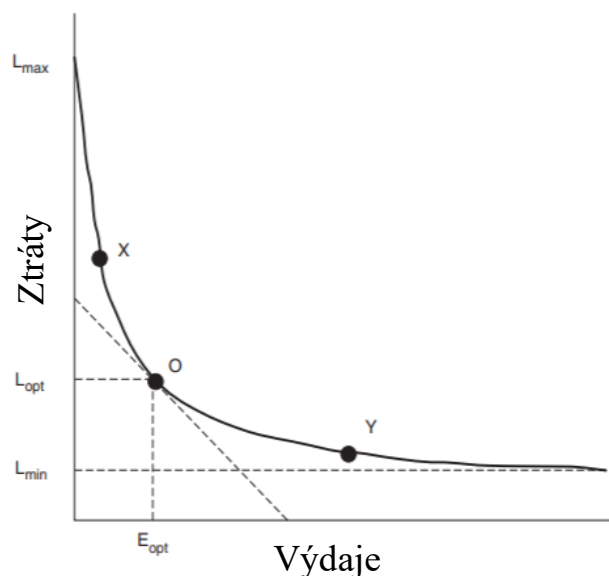
Typ mastitidy	PSB	Příznaky	Původce	Změny mléka
Klinická	≥ 400 000	otok a zarudnutí vemene	prokazatelný	vločky sraženiny, krev
Subklinická	≥ 400 000	-	prokazatelný	změna poměru nutrientů
Latentní	≥ 400 000	-	prokazatelný kontagiózní	-
Aseptická	< 400 000	-	neprokazatelný	-
Zdravé dojnice	prvotelky <100 000 ostatní <200 000	-	-	-

3.2 Ekonomické aspekty mastitidy

Mastitida je velmi nákladné onemocnění. Nejenže způsobuje ztráty snížením produkce a kvality mléka, ale v některých případech je nutné vyřazení zvířat z chovu. Další náklady je potřeba vynaložit na léky a ošetřování zvířat. Celkové náklady se mohou vyšplhat až na 185 € za jednu dojnici (Zigo et al. 2021). Tezera & Aman Eli (2021) odhadují snížení produkce o 15 % z jedné laktace, Krpálková et al. (2016) uvádí rozmezí ztráty mezi 110–552 kg, a to v závislosti na paritě a délce trvání mastitidy. Dlouhodobé důsledky mastitidy na produkci a udržitelnost mléka mohou být obzvláště negativní, pokud se jedná o prvotelky postižené v časném období laktace (Persson Waller et al. 2021). Celosvětové odhady ekonomických ztrát způsobené mastitidou se pohybují od 61 do 97 € za rok na jednu krávu. Ekonomické ztráty způsobené mastitidou mohou být chovateli značně podhodnocovány. V dotazníkovém šetření pouze 28 % z dotazovaných chovatelů odhadlo úroveň ztráty nebo ji mírně nadhodnotilo, zbylých 72 % zemědělců ztráty výrazně podcenilo. Maximální rozdíl mezi vypočtenými a očekávanými náklady byl 122 € na krávu za rok. Tyto výsledky zdůrazňují nutnost znalosti konkrétních ztrát způsobených mastitidou (Hogeveen et al. 2011). Značný vliv na minimalizaci nákladů má zemědělská politika Evropské unie. Jelikož se začala zaměřovat na liberalizaci trhu a snižování kompenzace pro zemědělce, tržby z prodeje mléka a hovězího masa klesly a zisk se stal závislý právě na minimalizaci nákladů (Wolfová et al. 2007).

Ztráty způsobené mastitidou představují již zmíněné úbytky dojivosti a celkové znehodnocení mléka. Jako výdaje označujeme další vstupy ke snížení ztrát způsobených mastitidou. Čím vyšší jsou výdaje vynaložené na prevenci, tím snáze se dá zabránit rozšíření onemocnění v chovu. Čím vyšší jsou výdaje preventivní, tím se snižují ztráty způsobené mastitidou a naopak. Pokud nebudou přijata žádná kontrolní opatření, ztráty jsou maximální. Při maximálních výdajích na kontrolu budou ztráty způsobené mastitidou minimální. Vztah mezi ztrátami a výdaji není lineární, existuje však optimální úroveň výdajů na kontrolu výskytu onemocnění (obrázek č. 1).

Tato optimální úroveň výdajů (preventivních opatření) je bodem, kdy další částka vynaložená na výdaje navrátí stejnou částku kvůli sníženým ztrátám (Hogeveen et al. 2011).



L_{max} – pokud nejsou vynaloženy žádné preventivní výdaje

L_{min} – pokud jsou vynaloženy maximální preventivní výdaje

L_{opt} – pokud jsou celkové výdaje optimální

X – zbytečně vysoké výdaje

O – optimální výdaje

Y – výdaje převažují snížené ztráty

Obrázek č. 1 Vztah vynaložených výdajů na celkové ztráty (Hogeveen et al. 2011)

3.3 Prevence

Na základě více než 70 let systematických studií mastitidy u přežvýkavců je přijímána obecná praxe, že toto onemocnění je multifaktoriální, a proto vyžaduje komplexní přístup ke snížení jeho výskytu (Zigo et al. 2021). Právě správný management zasušování, odpovídající výživa, pohodlí v rámci ustájení, čistota a vhodné vedení postpartálního období by měli snížit výskyt časně klinické mastitidy po otelení (Santos et al. 2004). Jednou z klíčových složek lepší kontroly tohoto onemocnění je identifikace původce bakterií vemene u krav. Vzhledem k rozmanitosti patogenů, které je třeba identifikovat, je mastitida považována za komplexní onemocnění (Kaczorek-Łukowska et al. 2021). Některé studie uvádějí, že je důležité se zabývat antimikrobiální rezistencí způsobenou nadměrným užíváním antibiotik. Jedním z možných řešení, jak snížit užívání léků, je výběr geneticky rezistentních zvířat, tedy jedinců, kteří mohou být odolnější vůči mastitidě (Moretti et al. 2021).

3.4 Legislativní požadavky na syrové mléko a dojení

Jakost syrového mléka určují legislativní normy:

- Nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 852/2004 o hygieně potravin,
- Nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 853/2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu

Tato nařízení jsou platná od 29. dubna 2004 a stanovují specifické hygienické předpisy pro potraviny živočišného původu. Konkrétní hygienické požadavky na produkci syrového mléka jsou uvedeny níže:

Syrové mléko musí pocházet od zvířat:

- která nevykazují žádné příznaky nakažlivého onemocnění přenosného mlékem na člověka;
- která jsou v dobrém zdravotním stavu, nevykazují příznaky onemocnění a zejména netrpí žádnou infekcí pohlavního ústrojí doprovázenou výtokem, ani enteritidou s průjmem, doprovázenou horečkou, nebo viditelným zánětem vemene;
- která nevykazují žádné poranění vemene, jež by mohlo změnit mléko;
- kterým nebyly podávány nepovolené látky či přípravky nebo která nebyla ošetřena zakázaným způsobem ve smyslu směrnice 96/23/ES;
- u nichž byla v případě podávání povolených přípravků či látek dodržena ochranná lhůta stanovená pro tyto přípravky a látky.

Dojení musí být prováděno hygienicky, a zejména musí být podle nařízení č. 853/2004 zajištěno:

- aby byly před zahájením dojení struky, vemeno a přilehlé části čisté;
- aby u každé jednotlivé krávy byly u mléka dojičem nebo metodou poskytující podobné výsledky zkontrolovány smyslové nebo fyzikálně – chemické změny a aby mléko zvířat, která vykazují klinické příznaky onemocnění vemene, nebylo použito k lidské spotřebě;
- aby mléko zvířat, která vykazují klinické příznaky onemocnění vemene, nebylo použito k lidské spotřebě jinak než podle pokynů veterinárního lékaře;
- aby koupele nebo postříky struků byly použity, pouze pokud je schválil příslušný orgán a způsobem, který nevede k nepřijatelným hladinám reziduí v mléce;
- aby byla identifikována zvířata, která se podrobila léčbě, která může vést k přenosu reziduí do mléka, a aby mléko od takových zvířat nebylo do konce předepsané ochranné lhůty použito k lidské spotřebě.

Osoby provádějící dojení anebo manipulují se syrovým mlékem musí:

- mít vhodný čistý oděv;
- dodržovat vysoký stupeň osobní čistoty.

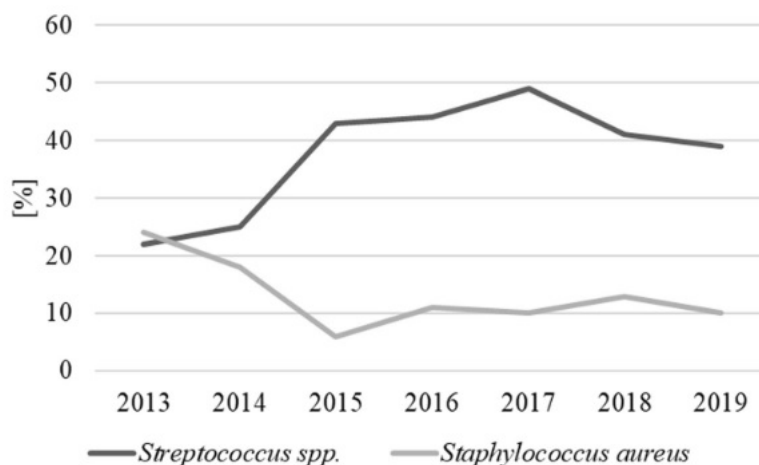
V blízkosti místa dojení musí být k dispozici vhodná zařízení, která dojičům a osobám manipulujícím se syrovým mlékem umožní omytí rukou a paží.

Provozovatelé potravinářských podniků musí zavést postupy zajišťující, aby počet celkových mikroorganismů v syrovém mléce byl 100 tis./ml a méně. Zároveň počet somatických buněk nesmí být vyšší než 400 tis./ml.

3.5 Patogenní mikroorganismy

Mléčné farmy jsou významným rezervoárem patogenů. Přítomnost potravinářských patogenů v mléce je způsobena přímým kontaktem s kontaminovanými zdroji v prostředí mléčné farmy a vylučováním z vemene infikovaného zvířete. Většina potravinářských patogenů obývá střevní trakt přežvýkavců, a proto je mléčný skot považován za velký rezervoár bakteriálních patogenů, jako například *Salmonella*, *Campylobacter* apod. U syrového mléka však některé mikroorganismy mohou způsobit mastitidu, v takovém případě jsou tyto patogeny vylučovány přímo do mléka. Uvedení syrového mléka kontaminovaného potravinovými patogeny do zpracovatelských závodů a jejich stálost v biofilmech představuje významné riziko kontaminace po pasterizaci, která by mohla vést k vystavení spotřebitele patogenním bakteriím (Oliver et al. 2005).

Existuje více než 130 bakteriálních patogenů, které jsou schopny infikovat mléčnou žlázu (Kaczorek-Łukowska et al. 2021). Nejčastěji jsou mastitidy klasifikovány podle způsobu přenosu patogenů, a to na environmentální a kontagiózní (Bradley 2002). První skupina zahrnuje mikroorganismy schopné přežít uvnitř mléčné žlázy, které mohou časem také žlázu poškodit. Infekční skupinu představují především *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis* a *Mycoplasma spp.* Infekce patogenů této skupiny se vyvíjejí hlavně v důsledku nedostatečné hygieny během a po dojení. Environmentální typ není přizpůsobený k přežití v mléčné žláze, ale ve vnějším prostředí, například *Escherichia coli* a *Streptococcus uberis* (Kaczorek-Łukowska et al. 2021). V současné době převažuje výskyt streptokokových mastitid (obrázek č. 2).



Obrázek č. 2 Změny v trendu etiologických faktorů mastitidy u mléčného skotu v severovýchodním Polsku v letech 2013–2019 (Kaczorek-Łukowska et al. 2021)

Mastitidy také můžeme dělit podle mikroorganismů, které zánět způsobují. Nejčastěji se jedná o bakterie, kvasinky, mykoplazmu a řasy (Bradley 2002).

Patogeny pronikají do mléčné žlázy strukovým kanálkem. Zpočátku se velmi rychle množí a způsobují poškození mléčné žlázy, což vede ke ztrátě sekreční funkce postižených laloků (Tančin & Tančinová 2008).

3.5.1 Streptokokové mastitidy

Streptokokové infekce mají kontagiózní charakter a řadíme je mezi hlavní původce mastitid (Opletal & Šimerda 2017). *Str. agalactiae* byl dříve považovaný za nejzávažnějšího původce infekčních mastitid. Nicméně v uplynulých deseti letech tento druh ztratil na významu a nahradily ho druhy *Str. uberis*, *Str. dysgalactiae* a *Str. equi subsp. Zooepidemicus*. Nebezpečné jsou z toho důvodu, že oproti jiným původcům mají specifickou ekologii v hostitelském organismu skotu a tím pádem se také rozdílně šíří.

Vznikající infekce je dále spojována s určitými rizikovými faktory typickými pro stádo jako jsou velikost stáda, plemeno, věk zvířat, typ podestýlky apod. Je důležité, aby dojnice, které trpí mastitidou byly dojeny jako poslední. Jinak by mohlo dojít k přenosu v důsledku nesprávné hygieny při dojení (Abebe et al. 2016). Léčba streptokokových mastitid spočívá v podávání antibiotik (Opletal & Šimerda 2017).

Streptococcus agalactiae

Streptococcus agalactiae je další nejčastěji prokazovaný původce infekčních mastitid (Shang et al. 2020). U infekce způsobené *Str. agalactiae* může PSB dosáhnout až 1 000 000/ml (Keefe 2012). Proniká z vnějšího prostředí do mléčné žlázy strukovým kanálkem, množí se v mléku a na povrchu epitelu mléčné žlázy k těmto tkáním velmi dobře adhezuje (Opletal & Šimerda 2017). Tato infekce velmi často vede k chronické subklinické mastitidě (Tong et al. 2019). K přenosu dochází zpravidla z nečistých rukou obsluhujícího personálu v rámci manipulace se zvířaty při dojení (Opletal & Šimerda 2017; Tomazi et al. 2018). Tento patogen se běžně vyskytuje na povrchu kůže, nosních dírek a vulvy a lze jej nalézt také v okolním prostředí, nicméně mimo mléčnou žlázu nepřežije dlouhou dobu (Keefe 2012).

Streptococcus dysgalactiae

Streptococcus dysgalactiae se vyskytuje jako saprofyt a epifyt ve sliznici nosu, hltanu a vagíny krav a také v mléčné žláze. Jedná se sice o kontagiózní mikroorganismus, dobře však přežívá i ve vnějším prostředí. Není pokládán za obligátní patogen mléčné žlázy skotu. Infekce vznikají ojediněle a nemají nakažlivý charakter. Vyznačují se rychlým nástupem příznaků akutního zánětu. Běžně se vyskytuje u zaprahých dojnic i jalovic před porodem. Jeho výskyt není neobvyklý ani u sajících telat (Opletal & Šimerda 2017).

Streptococcus uberis

Častým původcem subklinického zánětu je právě *Str. uberis* (Günther et al. 2016). Jedná se o grampozitivní bakterii, která patří mezi čtyři nejčastější druhy patogenů způsobující mastitidu (Sedky et al. 2020). Není zcela jasné, zda heterogenní fyziologie mastitidy je způsobena genetickou rozmanitostí různých kmenů infikujících vemena. Byly totiž popsány řady kmenů *Str. uberis*, které mohou indikovat klinické či subklinické infekce (Günther et al. 2016). Nicméně Abebe et al. (2016) uvádí, že environmentální patogeny jako jsou *E. coli*, *Str. dysgalactiae* a právě *Str. uberis* jsou původci mastitidy klinické, která má krátkou dobou trvání. Existuje řada případů, kdy bylo několik krav v chovu infikováno určitým kmenem

a po následné úspěšné léčbě se zánět vrátil, ale původcem byl tentokrát jiný kmen *Str. uberis*. Ze srovnání genomových sekvencí třinácti různých kmenů *Str. uberis* se neobjevila žádná jasná korelace se ztrátou nebo získáním genu s virulentním nebo avirulentním fenotypem kmenu. Z toho vyplývá, že vážnost infekce je do značné míry určován spíše interakcí hostitel – patogen než konkrétním genotypem patogenu. *Str. uberis* obecně vyvolává opožděný nástup zánětu v porovnání s infekcemi způsobenými dalšími původci mastitidy (Günther et al. 2016).

3.5.2 Stafylokokové mastitidy

Stafylokokové mastitidy mají kontagiózní charakter. Při diagnostice mastitidy se rozlišují koaguláza – pozitivní (CoPS) a koaguláza – negativní (CoNS) stafylokoky. Rozdíl spočívá v tom, že CoPS se díky produkci koaguláz dokážou při kontaktu s krví pokrýt fibrinem a chránit se tak před fagocytózou a dalšími mechanismy imunitního systému (Bagnicka et al. 2021). Kaczorek-Łukowska et al. (2021) uvádí, že stafylokoky převládají ve velkých farmách, kde nebyly pozorovány žádné zjevné problémy s hygienickou kvalitou mléka.

Zdá se, že CoNS postrádají schopnost způsobit těžkou mastitidu. Mají ale tendenci přetrvávat v mléčné žláze a tím mírně zvyšovat PSB. Rezistence vůči antimikrobiálním účinkům je u nich častější, ale mastitida způsobena CoNS reaguje na antimikrobiální léčbu mnohem lépe než v případě *S. aureus* (Taponen & Pyorala 2009).

Staphylococcus aureus

S. aureus je celosvětově nejčastější příčinou infekce vemene dojníc (Le Maréchal et al. 2011; Kaczorek-Łukowska et al. 2021). Mezi výskytem *S. aureus* a podílem epiteliálních buněk v kravském mléce byla zjištěna významná korelace, což naznačuje, že výskyt *S. aureus* v mléce odráží exfoliaci buněk epitelu mléčné žlázy a podílí se na jejím poškození (Nagasawa et al. 2019).

Možnost úplného vyléčení závisí především na faktorech léčby a je velice individuální. Pravděpodobnost uzdravení může klesat s rostoucím věkem, s vysokými počty somatických buněk a s délkou trvání infekce. V případě dlouhodobějšího onemocnění se infekce rozšiřuje do dalších čtvrtí vemene. Pokud se infekce dostane do zadních čtvrtí, je pravděpodobnost vyléčení mnohem nižší, než je tomu u předních částí (Barkema et al. 2006). Zjevným důvodem pro nevléčení je rezistence na penicilin, který se k léčbě nejčastěji využívá (Keefe 2012).

3.5.3 Koliformní mastitidy

Koliformní bakterie jsou gramnegativní bakterie, které patří do čeledi *Enterobacteriaceae* (Hogan & Larry Smith 2003). Pokud se jedná o mastitidu způsobenou koliformními bakteriemi, nedochází k přenosu mezi dojnícemi, ale zvířata jsou infikována z vnějšího prostředí. Jedná se tedy o mastitidu s environmentálním charakterem. Koliformní bakterie produkují toxiny, které jsou rychle vstřebávány do krve a způsobují akutní klinickou mastitidu (Tančin & Tančinová 2008). V závislosti na struktuře farmy a hygienickém stavu je přibližně 20–30 % případů zánětu vemene způsobeno gramnegativními mikroorganismy (Brennecke et al. 2021).

Escherichia coli

Escherichia coli jsou normální obyvatelé gastrointestinálního traktu teplokrevných zvířat (Hogan & Larry Smith 2003). Dojde-li ke vzniku onemocnění, zapříčiní je často poruchy ve výživě, funkční poruchy dojícího zařízení, traumatizace mléčné žlázy, či podchlazení. Tyto faktory vedou ke snížení odolnosti, a tak snáze dojde k nákaze (Tančin & Tančinová 2008). Mastitida způsobená *E. coli* je většinou subklinického charakteru, nicméně v extrémních případech může vést k závažným klinickým případům (Sun et al. 2021). Kromě toho je také jeden z hlavních původců metritidy (Tomazi et al. 2021).

Patří do skupiny bakterií, které fermentují laktózu. V případě identifikace na agaru tedy produkují kyselinu, která snižuje pH, což vede k výskytu typicky růžových kolonií (Schukken et al. 2012).

Klebsiella spp.

Klebsiella spp. se častěji vyskytuje ve stádech s nižším průměrem PSB. Může vyvolat agresivní zánětlivou reakci. Ve srovnání se zánětem vyvolaným *E. coli*, je spojena se závažnějšími klinickými příznaky a zvýšeným rizikem úmrtí nebo nutnosti porážky (Schukken et al. 2012).

3.5.4 Mykoplazmatické mastitidy

Mycoplasma bovis

Mycoplasma bovis je důležitým činitelem odpovědným za občasné dýchací potíže, klinickou mastitidu a prudký pokles produkce mléka, zejména u velkých stád (Aebi et al. 2012). Na druhou stranu, pokud jde o malá stáda s malým počtem zvířat, projevy vyplývající z přítomnosti *M. bovis* se vyskytují hlavně ve formě artritidy a pneumonie u telat a jalovic (Salina et al. 2020). Aebi et al. (2012) považují *M. bovis* za závažný patogen kvůli potížím s jeho diagnostikou, perzistencí, snadnému přenosu a skutečnosti, že antibiotická léčba většinou není efektivní.

3.6 Riziko konzumace kontaminovaného mléka

Mléko a mléčné výrobky mají potenciál přenášet patogenní organismy na lidskou populaci. Oliver et al. (2005) uvádějí konzumaci syrového mléka jako nejčastější způsob přenosu patogenů z potravin na člověka. Na začátku tohoto století bylo zjištěno, že skrze mléko se může přenášet také tuberkulóza, brucelóza a záškrť. Naštěstí se tato hrozba podařila výrazně snížit, a to díky zlepšení hygienických podmínek a technické pasteraci mléka (Galal Abdel Hameed et al. 2007). Pasterizace se sice považuje za bezpečnou metodu pro eliminaci přenosu, nicméně rostoucí počet případů, kdy byly patogeny v mléce nalezeny i po tomto tepelném ošetření, popřípadě nedůkladně provedené pasteraci naznačují, že sama o sobě pro zamezení kontaminace nestačí (Martin et al. 2018).

Všechny nutričně významné složky, díky nimž jsou mléko a mléčné výrobky důležitou součástí lidské stravy, také podporují růst patogenních organismů. Se zvyšujícím se PSB zároveň klesá obsah některých nutričně významných živin, především laktózy a kaseinu. U těžké klinické mastitidy lze snadno pozorovat abnormality mléka. Takové mléko se dojí zvlášť a je poté vyřazeno z objemu dodávky pro lidskou spotřebu. Díky tomu se nedostane do potravinového řetězce. Problém nastává v případě dojnice postižené subklinickou mastitidou, tj. bez viditelných změn. Mléko je zahrnuto do dodávky a vstupuje tak do potravinového řetězce (Oliver et al. 2005; Galal Abdel Hameed et al. 2007). Obsah patogenních mikroorganismů způsobuje zkracování doby trvanlivosti mléčných výrobků (Galal Abdel Hameed et al. 2007). Mléko dojnic, které podstoupily léčbu antibiotiky se automaticky vyřazuje z dodávky pro lidskou spotřebu po dobu trvání ochranné lhůty, protože obsahuje antimikrobiální rezidua. V případě, že jsou v syrovém mléce prokázána rezidua antibiotik výrobce značně ohrožuje veřejné zdraví a bezpečnost potravin a za tento prohřešek je pokutován (Oliver & Murinda 2012). Mléko je často infikováno *S. aureus*. Určité kmeny tohoto patogenu produkují tepelně odolné enterotoxiny, které způsobují nevolnost, křeče v břiše a zvracení. Mléčná žláza může být rezervoárem těchto enterotoxigenních látek, které mohou zapříčinit syndrom toxického šoku (Galal Abdel Hameed et al. 2007).

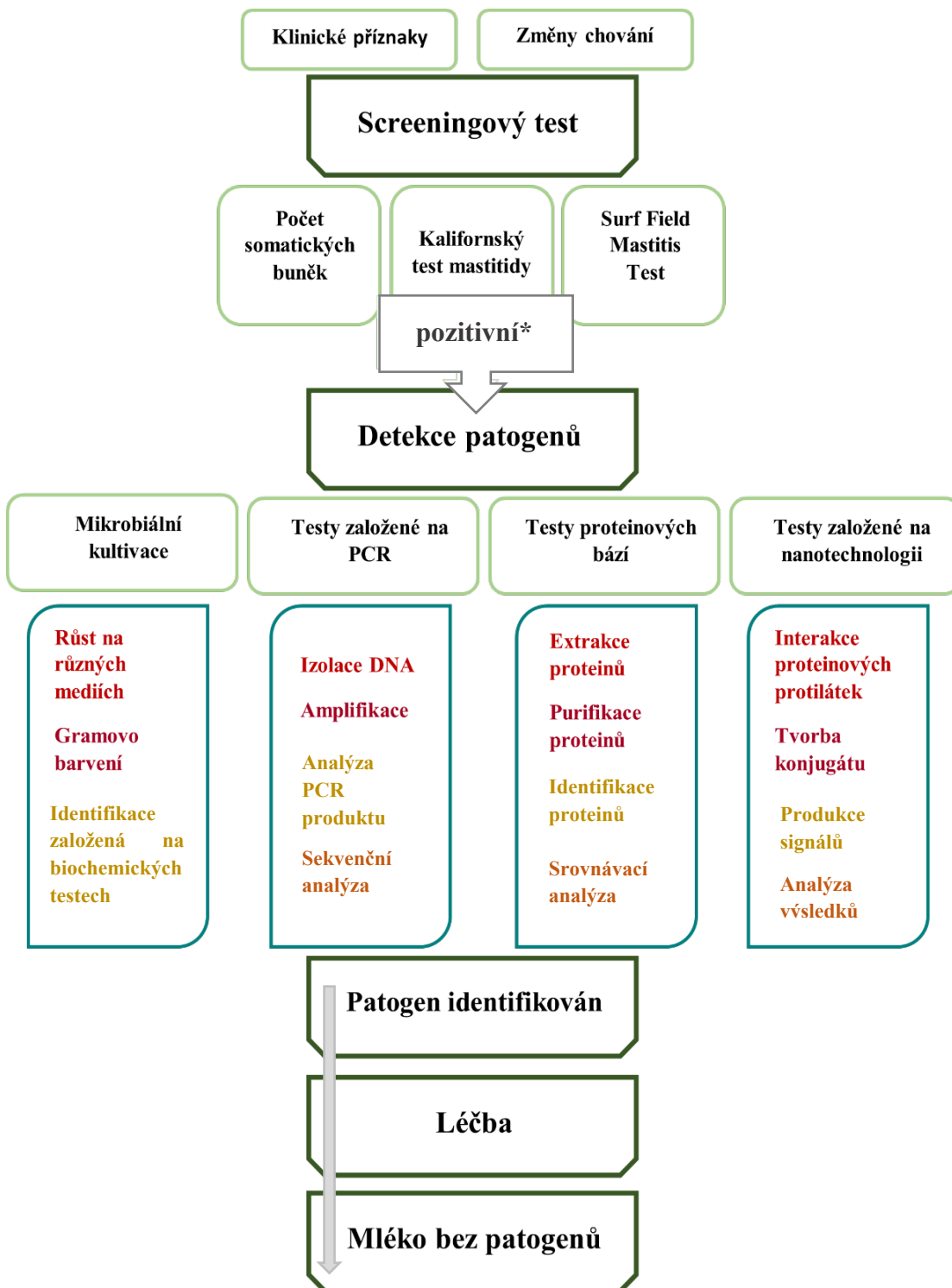
Bakterie *E. coli* produkuje Shiga-toxin. Ten ve vážnějších případech může způsobit hemolyticko-uremický syndrom, který vede až ke selhávání ledvin. Tento toxin bývá spojován i s výskytem ulcerózní kolitidy (Awadallah et al. 2016).

Mléko od krav postižených subklinickou mastitidou tedy významně ohrožuje lidské zdraví (Galal Abdel Hameed et al. 2007). *Str. agalactiae* je v lidské populaci poměrně rozšířen. Může se bez zjevných klinických projevů přenášet z matky na novorozeně (Galal Abdel Hameed et al. 2007).

3.7 Diagnostika mastitidy

Mastitida je diagnostikována na základě rozpoznání zánětlivé odpovědi zahájené poté, co imunitní systém detekuje infekci. Stejně jako u většiny bakteriálních onemocnění je velikost zánětlivé odpovědi závislá na virulenci patogenu a je regulována schopností imunitní odpovědi hostitele (Ruegg 2021). Mírná zánětlivá odpověď má za následek příliv neutrofilů do mléčné žlázy bez viditelných změn (subklinické onemocnění), zatímco vysoce zánětlivá odpověď způsobuje pozorovatelné lokalizované nebo generalizované příznaky – klinické onemocnění (Ruegg 2021).

Existuje mnoho dostupných konvenčních a moderních technik používaných k diagnostice infekčních bakterií. Konvenční testy jsou nepřímé metody diagnostiky, jejich výhodou je jednoduchost použití a příznivá cena (Ferronato et al. 2018). Mezi ně řadíme zjištění počtu somatických buněk (PSB), kalifornský test mastitidy (CMT), elektrickou vodivost a testy pH (Sedky et al. 2020; Wang et al. 2021). Mikrobiální kultivace je tradiční technika, která zahrnuje izolaci bakterií, identifikaci, mikroskopické vyšetření, Gramovo barvení, kultivaci na obohacených a selektivních médiích apod. (Sedky et al. 2020). Tradiční metody se opírají o mikrobiální kultivaci a biochemické testy. Tyto metody umožňují pouze detekci životaschopných bakterií, což může vést k falešně negativním výsledkům, které mohou vyřazením tohoto mléka negativně ovlivnit produkci (Ashraf & Imran 2018). Moderní techniky molekulární diagnostiky jsou cennější a nabízejí citlivější, rychlejší a spolehlivější výsledky. Nejvýznamnějšími metodami jsou polymerázová řetězová reakce (PCR), multiplexní PCR, real-time PCR a sekvenování celého genomu (Ashraf & Imran 2018). Postup diagnostiky mastitidy a její metody jsou uvedeny na obrázku č. 3.



*Alespoň jeden z uvedených

Obrázek č. 3 Přehled diagnostiky mastitidy (Ashraf & Imran 2018)

3.7.1 Kalifornský test mastitidy

Kalifornský test mastitidy (CMT) je snadno proveditelný, levný a rychlý způsob, jak diagnostikovat mastitidu přímo na farmě (Ferronato et al. 2018). Tento test je založen na koagulaci a viskozitě směsi, která prezentuje přítomnost a závažnost infekce (Tezera & Aman Ali 2021). Mléko se odebere z každého struku do mělké misky (Fufa et al. 2013), přidá se činidlo v poměru 1:1 a krouživým pohybem se směs míchá po dobu 15 vteřin (Tezera & Aman Ali 2021). Činidlo naruší buněčnou stěnu somatických buněk a dojde k uvolnění DNA z jádra. Ta zgelovatí a vytvoří vláknitou strukturu (Lakshmi & Jayavardhanan 2016). Interpretace výsledků CMT je uvedena v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3 Interpretace výsledků Kalifornského testu mastitidy (Lakshmi & Jayavardhanan 2016).

CMT skóre		průměrný PSB	Popis reakce
Negativní	0	100 000	Homogenní, beze změny
Stopové	+/-	300 000	Mírné zahuštění, reakce zmizí do 10 vteřin
1	+	900 000	Výrazné zahuštění, netvoří se gel
2	++	2 700 000	Okamžité zhoustnutí, gel se tvoří jen na dně
3	+++	8 100 000	Tvorba gelu, povrch směsi se zvedá

3.7.2 Kultivace bakterií

Kultivace je jedna ze základních technik diagnostiky a izolace patogenních mikroorganismů. Jedná se o přenesení mikrobiální kultury na živné médium, kde dojde k jejímu namnožení, které usnadní další podrobnější identifikaci. Kultivace je navíc proveditelná i přímo na farmě (Sedky et al. 2020).

Médií existuje celá řada. Rozlišují se selektivní či diagnostická nebo jejich kombinace a dále mohou být uzpůsobena podle reakce na Gramovo barvení. Na trhu jsou i média určená pro identifikaci konkrétního druhu mikroorganismu. Nejčastěji se používají agarová či krevní média. Vzorok mléka se za aseptických podmínek aplikují na médium. Inkubace probíhá při teplotě 37 °C, čas se může lišit, ale většinou kultivace trvá 24 hodin (Pan et al. 2020). Pokud je teplota inkubace nižší, inkubace může trvat až 52 hodin (De Arauz et al. 2012). Poté se odeberou typicky známé kolonie a před dalšími testy mohou podstoupit inkubaci znovu (Pan et al. 2020). Tyto vybrané kolonie se dále identifikují na základě Gramova barvení, biochemických testů (např. katalázový) nebo jsou hodnoceny dle typických charakteristik kolonií na agaru (Lakew et al. 2019; Shafi et al. 2021).

Katalázový test

Kataláza je enzym, který štěpí peroxid vodíku na vodu a kyslík. Kataláza pozitivní bakterie tento enzym produkují, při kontaktu s peroxidem tedy dochází k úniku bublinek. Tento test se používá výhradně pro rozlišení grampozitivních koků rodu *Staphylococcus* a *Streptococcus*. Katalázu produkují bakterie rodu *Staphylococcus* (Galal Abdel Hameed et al. 2007).

3.7.3 Počet somatických buněk

Hlavní změnu složení mléka v důsledku mastitidy zahrnuje přítomnost somatických buněk (Jadhav et al. 2016). Somatické buňky slouží jako hlavní obranná linie mléčné žlázy před nemocemi nebo intramamárními infekcemi (Baral et al. 2020). Jedná se o epiteliální buňky mléčné žlázy a buňky pocházející z krve, tj. leukocyty, monocyty, erytrocyty, makrofágy a neutrofilny (Jadhav et al. 2016). Somatické buňky mléka zahrnují 75 % leukocytů a 25 % epiteliálních buněk (Sharma et al. 2011). PSB se používá jako hlavní z faktorů hygienické kvality mléka. Zvýšený počet indikuje infekci mléčné žlázy (Jadhav et al. 2016). Na PSB mají významný vliv *Streptococcus agalactiae* a *Staphylococcus aureus*, proto jsou považovány za hlavní patogeny způsobující mastitidy (Keefe 2012).

Scherpenzeel et al. (2014) uvádí jako nízkou hodnotu PSB mezi 150-200 tis. buněk/ml. Naopak za nevyhovující PSB se podle Nařízení č. 853/2004 považují hodnoty nad 400 tis. buněk/ml. Některé studie uvádějí, že taktéž příliš nízké hodnoty PSB je abnormální stav, který může korelovat s vyšší náchylností k mastitidě (Rainard et al. 2018; Bach et al. 2021). Dojnice s mírně vyšším PSB mohou vykazovat vyšší rezistenci vůči mastitidě (Rainard et al. 2018).

3.7.4 Elektrická vodivost

Infekce vemene může vést nejen ke změně složení nutrientů mléka, ale také zvyšuje jeho slanost. To se projevuje změnou elektrické vodivosti, která je dána koncentrací aniontů a kationtů, zejména zvýšením hladiny chloridových iontů a iontů sodíku (Paudyal et al. 2020). Koncentrace chloridových iontů se vlivem infekce může navýšit z 75–113mg/100ml až na 130–198 mg/100 ml (Gáspárdy et al. 2012). Vodivost se zvyšuje i vlivem úbytku nevodivé laktózy (Caria et al. 2016). I přes zpochybnování této metody, jako spolehlivé detekce mastitid, je komerčně velmi dostupná a v mlékárnách běžně využívána (Paudyal et al. 2020). Běžná hodnota vodivosti mléka se pohybuje v rozmezí 4–5,5 mS/cm (Caria et al. 2016). V případech opakující se zvýšené vodivosti po dobu dvou a více měření o více než 15 %, můžeme hovořit o podezření na subklinickou mastitidu (Paudyal et al. 2020).

3.7.5 ELISA

Jednou z nejpoužívanějších imunologických metod, které jsou založené na specifické vazbě antigenu s protilátkou je metoda ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Jedná se o jednoduchou a rychlou laboratorní techniku (Aydin 2015), která se kromě detekce mastitidy používá při kontrole kvality v nejrůznějších odvětvích průmyslu (Baria s. r. o. 2019) a v lékařských výzkumech (Anonymous 2). ELISA se také využívá pro kvantifikaci bakterií. Její citlivost je ale pro jejich přímou kvantifikaci nedostatečná (Feligini et al. 2014). Byla vynalezena na začátku 70. let minulého století. Zpočátku byla detekce prováděna radioimunoanalýzou s použitím protilátek značených radioizotopy, ale kvůli zdravotním rizikům byly vyvinuty metody pro chemickou vazbu protilátek na biologické enzymy (Aydin 2015). Nejčastěji používanými enzymy jsou galaktosidázy, glukózooxidázy, peroxidázy a alkalické fosfatázy (Aydin 2015). Existuje několik modifikací základní metody ELISA, všechny však vycházejí ze stejných základních principů:

- Zachycení – přímá či nepřímá imobilizace antigenů na povrch jamky polystyrenové mikrodestičky.
- Blokování destiček – přidání irelevantního proteinu nebo jiné molekuly k pokrytí všech nenasycených vazebných míst na povrchu jamky mikrodestičky.
- Sondování / detekce – inkubace s antigenově specifickými protilátkami, které se afinitně váží na antigeny.
- Měření signálu – detekce signálu generovaného prostřednictvím přímého nebo sekundárního štítku (tag) na konkrétní protilátce. (Anonymous 2).

V případě diagnostik mastitidy se identifikují určité proteiny (Bentley Czech s. r. o. 2013), či stafylokokové enterotoxiny jako účinné biomarkery (Šťástková et al. 2012). V případě proniknutí mastitidního patogenu do organismu dojnice dochází nejprve k systémové nespecifické reakci, kterou zprostředkovávají cytokiny. Tato imunitní reakce se může projevit horečkou, snížením chuti k jídlu, ale především dochází ke změně koncentrace některých plazmatických proteinů (Soler et al. 2019).

K diagnostice mastitidy se využívá například přítomnosti těchto proteinů:

- **Mléčný amyloid (MAA)** se tvoří v mléčné žláze a objevuje se zejména při akutní fázi zánětu, kdy je jeho obsah až tisíckrát vyšší než u zdravých dojnic. Jaeger et al. (2017) zjistili hodnoty koncentrace MAA vyšší než 7,5 µg/ml, mezní hodnota se přitom pohybuje mezi 0,8 a 7,0 µg/ml.
- **Inter alpha trypsin inhibitor heavy chain 4 (ITIH4)** je sérový protein, který se účastní inhibice zánětlivých buněk. Jeho hodnoty v infikovaném mléce jsou až dvanáctkrát vyšší. (Soler et al. 2019).
- **Haptoglobin** tento protein je významným biomarkerem mastitidy koz (Windria et al. 2021).

Metody založené na imunoanalýze vyžadují velice specifické protilátky, které jsou těžko k dostání (Ďuráčová et al. 2018). Čas reakce enzymu se substrátem se pohybuje od 30 do 60 minut. Výsledky se vyhodnocují pomocí spektrofotometru při vlnové délce 400-600 nm (Aydin 2015).

Metodu ELISA lze použít v následujících uspořádáních:

1. **Přímá** je oproti ostatním modifikacím nejrychlejší, protože k jejímu provedení je zapotřebí méně kroků. Díky tomu je také méně náchylná k chybám. Dochází k reakci imobilizovaného antigenu na pevný povrch protilátky, značený enzymem. Ten následně reaguje se substrátem za vzniku měřitelné barevné změny. Nevýhodou je její nižší citlivost. Imobilizace antigenu totiž není specifická (Aydin 2015) a to kvůli tomu, že vzorek obsahuje několik proteinů, včetně toho cílového – všechny se váží natu samou destičku (Baria s. r. o. 2019).
2. **Nepřímá**-k identifikaci slouží sekundární protilátka označená enzymem, která je přidána do séra. Během inkubace se u pozitivních vzorků vytvoří protilátky proti antigenu. Po přidání substrátu pro enzym se stanovuje koncentrace (Aydin 2015). Vyšší citlivost je dána tím, že se primární protilátka může vázat na více než jednu sekundární protilátku. Díky možnosti použití univerzální protilátky se jeví jako cenově výhodnější metoda. Nepřímé testy ELISA vyžadují více inkubačních kroků, jsou tedy časově náročnější (Baria s. r. o. 2019).
3. **Sendvičová** využívá komplexních proteinových vzorků, protože dochází spíše k imobilizaci pouze specifického antigenu nežli proteinů. Charakteristické je použití dvou protilátek specifických na různé epitopy (tj. konkrétní oblast antigenu, na kterou se vážou protilátky) jednoho antigenu (Aydin 2015). Jedna z protilátek je navázána na povrch jamek destičky a vychytává antigen ze vzorku (Soler et al. 2019). Druhá protilátka značená enzymem slouží k detekci tohoto antigenu (Anonymous 2; Baria s. r. o. 2019). Identifikovaný protein se v podstatě „zasekne“ mezi dvěma protilátkami – odtud nese název sendvičová ELISA (Aydin 2015).
4. **Kompetitivní** využívá k detekci antigenu interference signálu. U této metody je povrch jamek potažen antigenem specifickým pro protilátku. Testovaný vzorek se nejprve smíchá s protilátkou a až poté se nanese na destičku. Následně se přidá sekundární značená protilátka (Aydin 2015). Čím více primární protilátky bude vyvázáno antigenem ze vzorku, tím slabší bude detekovaný signál (Baria s.r.o. 2019).

3.7.6 MALDI-TOF MS

K identifikaci bakteriálních druhů lze také použít hmotnostní spektroskopii pomocí laserové desorpční ionizace s maticí (MALDI-TOF MS), která zajišťuje kontakt analyzované molekuly s laserem tak, aby nedošlo k nežádoucí fragmentaci. Analyzátor měří čas potřebný k tomu, aby každý iont dosáhl detektoru a zároveň zaznamenává čas a trajektorii průletu (Duarte et al. 2015). Metoda je založena na získání proteinového spektra (Carbonnelle et al. 2011; Alnakip et al. 2020). Jedná se o spolehlivou, snadno použitelnou a nákladově efektivní techniku, která má potenciál nahradit či doplnit konvenční fenotypovou identifikaci a dosáhnout hodnot citlivosti a specifity 100 %. Nicméně schopnost MALDI-TOF MS v identifikaci je omezena na konkrétní spektrální databáze stávajících z profilů bakteriálních proteinů. Tato technologie je stále příliš nákladná na to, aby mohla být rozšířena v diagnostických laboratořích (Duarte et al. 2015).

MALDI-TOF MS vyžaduje převedení na intaktní izolované ionizované molekuly v plynné fázi. Poté se ionty po migraci v elektrickém poli oddělí podle své molekulové hmotnosti. Každá detekovaná molekula je charakterizována molekulovou hmotností, nábojem, a relativní intenzitou signálu. (Carbonnelle et al. 2011).

Ngassam Tchamba et al. (2019) porovnávali tuto metodu s qPCR a došli k výsledku, že obě metody mají výsledky na stejné úrovni. Zásadním rozdílem je, že databáze MALDI – TOF MS ještě stále neobsahuje všechny bakteriální druhy, které se mohou vyskytovat v kravském mléce. Další srovnání provedli i Alnakip et al. (2020), kteří porovnávali metodu MALDI – TOF MS a sekvenování 16S rRNA. Autoři považují obě metody za rovnocenné, avšak spektroskopická metoda dosáhla lepšího výsledku, jelikož bylo možno identifikovat více patogenních mikroorganismů. Výhodou MALDI-TOF MS je možnost rychlé identifikace bakterií, která se pohybuje v řádu minut (Wieser et al. 2012).

3.8 Molekulárně genetické metody

Vzhledem k problémům, které souvisí s diagnostikou mastitidních patogenů tradičními mikrobiologickými metodami, jako jsou doba trvání, či falešně negativní výsledky, se pro tyto účely začaly využívat molekulární metody založené na detekci nukleových kyselin. Zaměřují se na specifické sekvence bakteriálního genomu spíše než na fenotypovou expresi produktů, které tyto sekvence kódují (Gillepsie & Oliver 2005).

Molekulární detekce patogenních mikroorganismů je založena na DNA amplifikaci cílového patogenu. Účinná extrakce DNA z patogenních bakterií je proto hlavním krokem k efektivnímu stanovení (Cremonesi et al. 2006).

Použití molekulárních technik ve veterinární diagnostice je běžnou záležitostí. Tyto metody mají potenciál detekovat patogen s vysokou citlivostí a specificitou. Nástup metody PCR spolu s jejími různými rozšířeními, jako je multiplex PCR, real-time PCR apod., napomohl zvýšení citlivosti těchto technologií (Ashraf & Imran 2018).

3.8.1 Izolace nukleových kyselin

Základním krokem u většiny metod molekulární biologie je izolace nukleových kyselin za účelem získat DNA nebo RNA patogenních bakterií. U detekce mastitidy se genetická informace bakterií izoluje nejčastěji přímo z mléka. Brennecke et al. (2021) uvádí, že složky patogenu, tj. DNA a endotoxiny, lze stále nalézt i v krvi zvířat, je ale sporné, do jaké míry je možné na tuto variantu spoléhat při indikaci systémové léčby. Důvodem je, že patogeny z krve byly detekovány pouze u 1,4 % krav, které trpěly klinickou mastitidou. Naopak metoda izolace bakterií přímo z mléka měla úspěšnost detekce téměř 76 %.

DNA je potřebná v dostatečné kvalitě i množství. Kvalitou se rozumí dostatečně koncentrovaný vzorek. DNA určená k hybridizaci musí být zbavená kontaminujících látek jako jsou proteiny, glykogen nebo ionty kovů (Šmarda et al. 2005; Šána et al. 2017).

Prvním krokem při zpracovávání jakéhokoliv biologického materiálu je dezintegrace buněk, popřípadě tkání a jejich homogenizace. Pokud je to možné, vzorek by měl být čerstvý, popřípadě zamražený či lyofilizovaný. Tím se zabrání degradaci nukleových kyselin enzymy, které jsou přítomné v buněčném extraktu.

Dalším krokem je lyze, při které dochází k narušení buněčné stěny. Podle typu materiálu pak Šána et al. (2017) rozlišují lyzi:

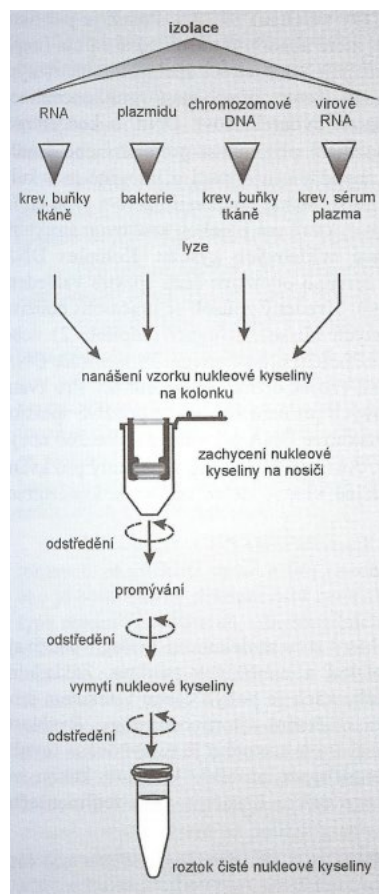
- Biologickou – pomocí enzymů
- Chemickou – působením detergentů
- Fyzikální – mechanické dělení, sonikace
- Kombinaci těchto metod

Stěny bakteriálních buněk se rozrušují pomocí lysozymu, detergentů a chelatačního činidla. Nejčastěji se používá činidlo EDTA (etylendiaminotetraoctová kyselina), které destabilizuje vnější bakteriální membránu. Aby zůstala izolovaná DNA neporušená, je třeba dbát a udržovat lyzační směs v pufrovaném médiu a v chladu.

Získaný lyzát však ještě kromě nukleových kyselin obsahuje i další buněčné složky, proto následuje jejich extrakce a purifikace. Z purifikované DNA se odstraní RNA, a to působením ribonukleázy. Přidáním proteinázy K, se odstraní z buněčných lyzátů proteiny (Šmarda et al. 2005; Kočárek 2007). Mezi novější techniky patří metoda, ve které se využívá právě adsorpce nukleových kyselin na silikátový povrch. Posledním krokem izolace je precipitace DNA alkoholem. Právě díky srážení alkoholem převedeme nukleovou kyselinu do menšího objemu. Agregát pak při centrifugaci sedimentuje na dno zkumavky. Pokud je třeba DNA dlouhodobě skladovat, je vhodné ji rozdělit do několika alikvotů a zmrazit (Šmarda et al. 2005; Kočárek 2007).

Při purifikaci nukleových kyselin na chromatografických kolonkách (obrázek č. 4) se kombinují metody chromatografie a centrifugace. Tyto způsoby zajišťují vzorky vysoké čistoty.

Prvním krokem je gelová chromatografie. Menší molekuly prostupují přes náplň do porézní matrice, čímž se zpomalí jejich pohyb kolonkou. Zatímco molekuly větší, nukleové kyseliny, neprostupují a procházejí kolonkou rychleji. Tento typ purifikace představuje účinnou alternativu k purifikaci DNA srážením alkoholem. (Šmarda et al. 2005).



Obrázek č. 4 Izolace a purifikace nukleových kyselin na chromatografických kolonkách (Šmarda et al. 2005)

3.8.2 Stanovení koncentrace DNA

Pro další použití je často nutné stanovit koncentraci DNA ve vzorku. Nukleové kyseliny absorbují nejintenzivněji světlo o vlnové délce 260 nm. Z hodnot optické hustoty pak lze podle empirických vztahů stanovit koncentraci DNA ve vzorku. V současné době se používá metoda spektrofotometrická a fluorescenční.

Spektrofotometrická metoda

Jedná se o přímé spektrofotometrické stanovení v UV světle. Tuto metodu lze použít za předpokladu, že koncentrace DNA je dostatečná, tedy vyšší než 25 mg/l a vzorek není významně znečištěný např. bílkoviny. Co se týká této metody, koncentraci lze vypočítat z optické denzity vzorku (Rosypal et al. 2005; Kočárek 2007). Spektrofotometrická metoda je vhodná pro rutinní měření koncentrace, díky uživatelsky jednoduchému softwaru a časové nenáročnosti. Některé spektrofotometry dokážou změřit koncentraci z minimálního množství, tj. <math><1\mu\text{l}</math> neředěného roztoku. Další výhodou spočívá v jejich ceně (Zvárová et al. 2012).

Značná nevýhoda spočívá v tom, že z důvodu absorpce UV záření není možné použít skleněnou kyvetu. Spektrofotometrickým stanovením navíc není možné zjistit, jestli je DNA fragmentovaná a vlivem vysokého znečištění může docházet k nepřesným měřením – obsahuje-li vzorek příliš bílkovin, změřená koncentrace je vyšší (Zvárová et al. 2012).

Fluorescenční metoda

Je vhodná v případě, že koncentrace nukleových kyselin ve vzorku je nízká (nižší než 25 mg/l) nebo také pokud je vzorek významně znečištěn přítomností jiných látek, jako jsou bílkoviny (Kočárek 2007).

Toto stanovení používá speciálně vyvinutá fluorescenční barviva, která se vážou na nukleové kyseliny a proteiny. Tato barviva emitují signál pouze v případě, že se navážou na specifický cíl (Zvárová et al. 2012). Vážou se na šroubovice nukleových kyselin a při ozáření UV světlem intenzivně fluoreskují (Kočárek 2007). Pokud chceme zjistit míru kontaminace proteiny, používá se jiné barvivo než na nukleové kyseliny. Stejně jako u spektrofotometrie nelze rozlišit fragmentovanou DNA. Hlavní nevýhodou je časová náročnost a cena fluorescenčních barviv (Zvárová et al. 2012).

3.8.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Jednou z nejpoužívanějších metod při detekci patogenů z potravin je polymerázová řetězová reakce (PCR) (Law et al. 2015). Jedná se o účinný a jednoduchý postup pro syntézu velkého množství specifické DNA *in vitro* (Glick & Pateen 2017). Tato metoda byla vynalezena před téměř 40 lety a umožňuje rozpoznání bakteriálního patogenu detekcí specifické cílové sekvence DNA (Law et al. 2015). PCR je schopna detekovat organismy, u kterých je alespoň částečně známa jejich sekvence a tím pádem je možné navrhnout pro tyto organismy primery (Houf et al. 2000). Podstatou PCR je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků DNA ve směru 5' → 3' pomocí DNA polymerázy. Zkoumaný úsek sekvence je ohraničen připojením dvou primerů, které se váží na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3' konce směřují proti sobě. Po přidání DNA polymerázy a nukleotidů probíhá syntéza nových vláken na obou templátových řetězcích protisměrně. K syntéze DNA se užívají termostabilní polymerázy pocházející přímo z termofilních mikroorganismů. Nejznámější je pravděpodobně *Taq* DNA polymeráza z *Thermus aquaticus*, který odolává vysokým teplotám. Tyto termostabilní polymerázy umožňují, aby syntéza DNA probíhala opakovaně v cyklech (Šmarda et al. 2005).

Při PCR se amplifikuje specifická cílová sekvence DNA v cyklickém procesu o třech základních krocích:

- Úvodní denaturace
 - Denaturace
 - Anelace
 - Extenze (elongace)
- Závěrečná elongace

V prvním cyklu dochází k počáteční denaturaci. Dostatečná délka tohoto kroku zajistí úplné rozpletení dvoušroubovice DNA (Schmidt et al. 2015). Některé polymerázy jsou tzv. „hot start“. Jejich účelem je optimalizovat požadovaný výtěžek reakce a zároveň potlačit nespecifickou amplifikaci primerů – dimerů. Úvodním zahřátím se dosáhne inhibice hybridizace primerů (Green & Sambrook 2018). Dále je cílová dvouvláknová DNA denaturována do jednořetězcové DNA při vysoké teplotě. Poté dva jednovláknové syntetické oligonukleotidy nebo specifické primery budou hybridizovat s řetězcí DNA. Následuje

elongace, kdy se primery komplementární k jednořetězcové DNA prodlužují přítomností deoxyribonukleotidů a termostabilní DNA polymerázy (Law et al. 2015). Na závěr dochází k závěrečné extenzi, která zajišťuje plné dosyntetizování produktů. Produkty amplifikace PCR mohou být vizualizovány na gelu při elektroforéze (Calonzi et al. 2020).

3.8.3.1 Příprava reakce

PCR reakci předchází příprava reakční směsi. Ta obsahuje kromě vody a templátové DNA ještě následující složky:

Reakční pufr, který dodá reakci potřebnou koncentraci solí a potřebné pH. Koncentrace solí ovlivňuje specificitu reakce, protože ovlivňuje specificitu nasedání primerů. U některých výrobců reakční pufr obsahuje i **MgCl₂**, který je důležitý pro správnou funkci polymerázy. **Volné nukleotidy (dNTP), primery a polymerázu.**

Pro negativní kontrolu se většinou používá voda, pro pozitivní kontrolu naopak vzorek, který nám zajistí požadovaný výsledek (Anonymous 1).

3.8.4 Gelová elektroforéza

Elektroforéza na agarózovém gelu je efektivní způsob separace nukleových kyselin (Lee et al. 2012). Metoda je založena na pohybu molekul DNA. Ta je díky fosfátovým skupinám nabitá záporně a ve stejnosměrném elektrickém poli se při pH 8 bude pohybovat ke kladné elektrodě. Gelovou elektroforézou se separují molekuly DNA na základě rozdílných rychlostí pohybu molekul DNA v agarózovém gelu, které jsou nepřímo úměrné velikosti molekuly DNA (Lee et al. 2012).

Agaróza je polysacharid, který se skládá z jednotek D-galaktózy a anhydro-Lgalaktózy (Zvárová et al. 2012). Při elektroforéze se používá nejčastěji 1,5 % agaróza, nebo gel na bázi polyakrylamidu (Silva et al. 2021). Obrázek č. 5 na gelu znázorňuje detekci patogenů izolovaných z mléka. K negativní kontrole se používá nejčastěji voda (Parin et al. 2017). Obecně platí, že čím vyšší je koncentrace agarózy, tím menší je velikost pórů. Tradiční agarózové gely jsou nejúčinnější při separaci fragmentů DNA mezi 100 bp a 25 kb. Fragmenty DNA menší než 100 bp jsou účinněji separovány pomocí elektroforézy na polyakrylamidovém gelu. Na rozdíl od agarózových gelů je polyakrylamidová gelová matrice tvořena chemickou reakcí řízenou volnými radikály (Lee et al. 2012).



M – marker, a – *Streptococcus agalactiae*, b – *Streptococcus uberis* c – *Streptococcus parasanguinis*, d – *Streptococcus oralis*, e – *Enterococcus faecalis*, f – *Aerococcus viridans*, g *Lactococcus garvieae*, h – negativní kontrola

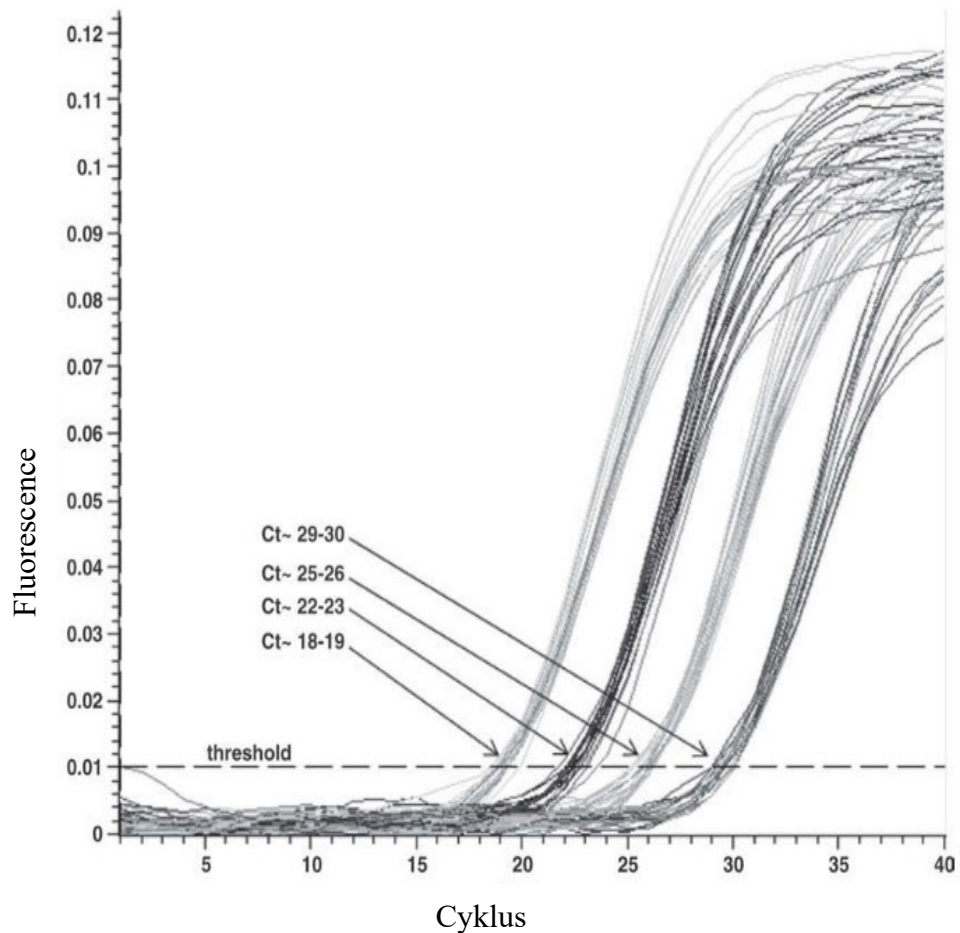
Obrázek č. 5 Gelová elektroforéza produktů multiplex PCR (Raemy et al. 2013)

3.8.5 Real-time PCR (qPCR)

Pro kvantitativní PCR v reálném čase se používají speciální termocyklery (tzv. světelné termocyklery), v jejichž nitru je vzorek ozařován excitačním UV zářením, které indukuje fluorescenci příslušného barviva. Po každém cyklu změří intenzitu fluorescence speciální detektor, jenž převádí výsledky do počítače. Specializovaný program pak průběžně neboli v reálném čase zaznamenává koncentraci fluorescenčního barviva, které odpovídá množství vzniklého amplikonu. Výhodou je, že relevantní výsledky lze často odečíst dříve, než proběhnou všechny naprogramované cykly (Kočárek 2007). Hlavním rozdílem oproti klasickému PCR testu tedy je, že qPCR umožňuje kontinuálně monitorovat přibývajícím množství produktu v průběhu celé reakce. Podmínkou je přítomnost fluorescenční látky, která se specificky či nespecificky váže na syntetizovanou DNA (Šána et al. 2017). Určitou modifikací je tzv. Multiplex real-time PCR, která se používá v diagnostice mastitidy. Metoda je založena na technice, při které jsou specifické části z genomu různých mikrobiálních druhů (primery) znásobeny a detekovány současně ze vzorku mléka. Jedná se tedy o reakci, ve které se využívá více jak jeden pár primerů, které se váží k různým úsekům templátové DNA (Hiitiö et al. 2018).

V optimálních podmínkách se množství zkoumané vyšetřované genové sekvence ve vzorku s každým cyklem zdvojnásobí. Prahová hodnota (dále jen C_t – threshold) reflektuje cyklus, kde dochází k nárůstu fluorescence nad vizuální šum pozadí, které se v reakci vyskytuje. Čím dříve je detekční limit překročen, tím více cílové DNA vzorek obsahuje. Tedy, čím nižší je C_t , tím vyšší je množství DNA amplifikovaného patogenu ve vzorku. Maximální počet cyklů je 40. Výsledkem testu je seznam všech detekovaných mikroorganismů a jejich hodnoty C_t (Hiitiö et al. 2018). Tato metoda je díky své jednoduchosti, rychlosti a citlivosti ideálním nástrojem pro kvantifikaci nukleových kyselin (Bustin et al. 2009). Amplifikační křivka (obrázek č. 6) je tvořena hodnotami fluorescence vnesenými do bodového grafu oproti jednotlivým cyklům reakce, ve kterých byly detekovány (Šána et al. 2017). Vyhodnocení pozitivní nebo negativní reakce je založeno na získání C_t hodnoty a srovnáním této hodnoty s vnitřní amplifikační

kontrolou (Taponen et al. 2009). Kvantifikace je častěji prováděna buď jako relativní, kdy se množství fluorescence testovaného vzorku porovnává s množstvím fluorescence jiného vzorku, nebo absolutní, kdy množství DNA odečítáme z kalibrační křivky, které nám poskytne vzorek DNA o dané koncentraci (Anonymous 1) Přítomnost *Staphylococcus aureus* je považována v případě, že hodnoty C_t dosahují 19 ± 0.9 . *Streptococcus uberis* vykazuje hodnoty C_t $11,3 \pm 0,5$. *Str. agalactiae* vykazuje C_t $16,1 \pm 0,5$ (Gillespie & Oliver 2005).



Obrázek č. 6 Amplifikační křivka real – time PCR (Taponen et al. 2009)

PathoProof Mastitis PCR Assay

PathoProof Mastitis PCR Assay je komerční kit pro qPCR analýzu. Test zahrnuje předem stanovené oligonukleotidy pro cílové genové sekvence určitých mikrobiálních druhů, které nejčastěji způsobují mastitidu. Je schopen identifikovat všechny hlavní bakterie z kravského mléka (Hiitiö et al. 2018). Kit slouží pro přesnou identifikaci bakterií z kravského mléka pomocí kvantitativní qPCR. Sada obsahuje všechna potřebná činidla pro izolaci DNA a následnou qPCR reakci.

Kromě o poznání rychlejších výsledků a jednoduchosti přípravy jeho výhoda spočívá také v minimalizaci rizika kontaminace v laboratoři. Detekci je možno provádět u syrového, mrazeného nebo konzervovaného mléka (Thermo Fisher Scientific 2014).

K dispozici jsou celkem 4 reagenční sady, PathoProof Mastitis Complete – 16 Kit PathoProof, Mastitis Complete - 12 Kit pro identifikace hlavních mastitidu způsobujících bakterií, PathoProof Mastitis Major - 3 Kit, PathoProof Mastitis Major - 4 Kit pro identifikaci vysoce nakažlivých bakterií. Například pomocí Mastitis Complete – 12 Kitu je možné identifikovat tyto bakteriální druhy či skupiny:

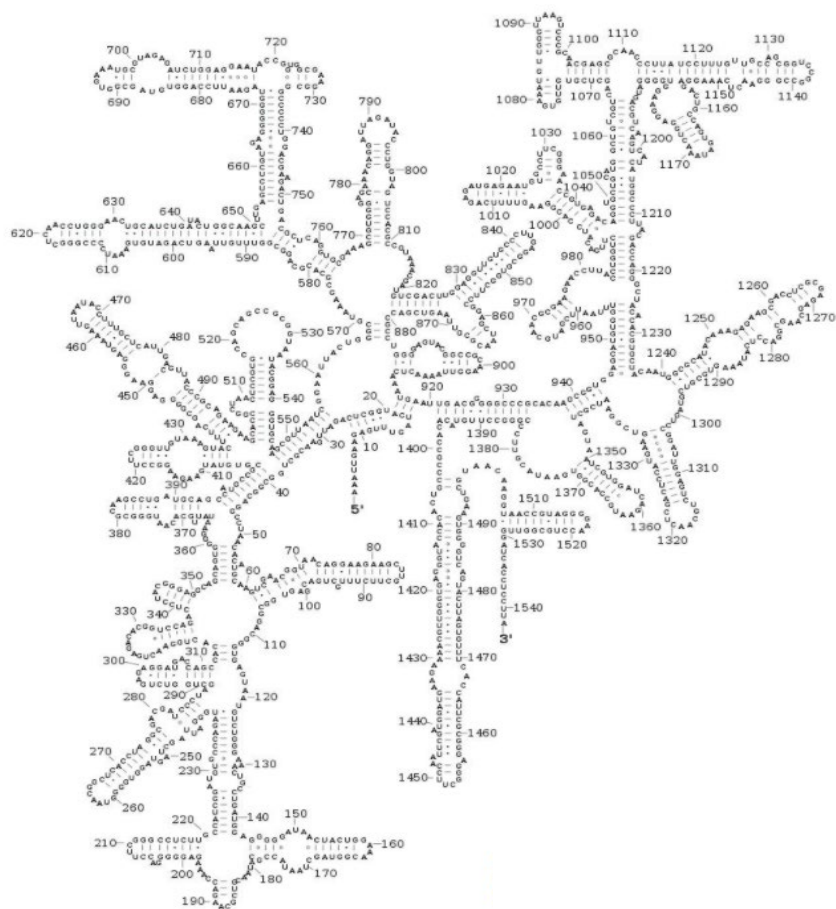
- *Staphylococcus aureus*
- *Enterococcus spp.*
- *Corynebacterium bovis*
- *Escherichia coli*
- *Streptococcus dysgalactiae*
- *Staphylococcus spp.* (včetně *Staphylococcus aureus* a CoNS)
- *Streptococcus agalactiae*
- *Streptococcus uberis*
- *Klebsiella oxytoca*
- *Serratia marcescens*
- *Arcanobacterium pyogenes*
- β -lactamázový gen (zodpovědný za rezistenci staphylokoků na penicilin)

Pro detekci bakteriálních původců mastitid se získaná data analyzují pomocí softwarové aplikace Norden Lab Mastitis Studio (Thermo Fisher Scientific 2014).

3.8.6 Částečné sekvenování 16S rRNA

V 80. letech byl zahájen vývoj nového standardu pro identifikaci bakterií. Ukázalo se, že fylogenetické vztahy bakterií lze určovat srovnáním části genetického kódu. Jedná se o stanovení nukleotidové sekvence nukleotidů jejich genu kódujícího 16S podjednotku ribosomální RNA (obrázek č. 7) (Clarridge 2004). Parin et al. (2017) uvádějí délku genu na 1400 páru bází (bp), Clarridge (2004) až 1550 bp. Navíc jej lze srovnávat nejen mezi všemi bakteriemi, ale také s genem 16S rRNA archeobakterií a s genem 18S rRNA eukaryot (Clarridge 2004). Byla vyvinuta metoda PCR pro detekci *Strep. agalactiae* v mléce, která se zaměřovala na konzervované oblasti uvnitř 16S rRNA. (Gillespie & Oliver 2005). Gen 16S rRNA nemusí být identický pro všechny organismy. Může se v průběhu evoluce měnit a rychlost změny se může lišit na různých místech v celém genu 16S rRNA, tzv. „hot spots“, které vykazují větší počet mutací. Bakteriální genomová DNA je extrahována z celých buněk pomocí komerčních kitů a následně je použita jako templát PCR pro amplifikaci (Clarridge 2004). Sekvence získané jako elektroforeogramy jsou vizualizovány pomocí softwaru (Salina et al. 2020). Tyto sekvence se dále porovnávají s dostupnými databázemi. Sekvenční diverzita, která poskytuje schopnost rozlišovat mezi bakteriálními druhy, se liší napříč genem 16S rRNA. Sekvenování genů 16S rRNA, které nevyžaduje kultivaci, nabízí způsob, jak obejít hlavní nevýhody identifikace založené právě na kultivaci (Watts et al. 2017). Sekvenování 16S rRNA genu může být méně citlivé a pomalejší než testy specifické pro patogenní PCR pomocí panelů primerů. Nicméně v klinickém prostředí bylo obzvláště užitečné v případech, kdy jsou bakterie neidentifikovatelné kultivací, protože jsou náročné, neobvyklé nebo biochemicky neaktivní (Watts et al. 2017).

Získané sekvence byly analyzovány a porovnány s kmeny z GenBank. Charakterizace umožňovala identifikaci na úrovni poddruhu. Získané genové sekvence 16S rRNA byly uloženy do databáze GenBank (Alnakip et al. 2020).



Obrázek č. 7 16S rRNA (Center for Molecular Biology of RNA 2021)

3.8.7 DNA čipy a hybridizace

Mezi další způsoby detekce mastitidních patogenů na molekulárně genetické úrovni spadá technologie microarrays a hybridizace/blotting (El-Sayed et al. 2017).

Kombinace hybridizace/blottingu může být použita k nalezení korelace mezi proteiny a fragmentem DNA a ke zjištění, které geny jsou odpovědné za produkci určitých proteinů. Na rozdíl od PCR závisí koncept hybridizace na použití jednořetězcové DNA sondy značené fluoroforem, která je mnohem delší než oligonukleotidové primery použité v PCR (El-Sayed et al. 2017). Dle množství navázané cílové DNA se projeví intenzita fluorescenčního signálu (Šťásková et al. 2012).

Oligonukleotidové DNA čipy se skládají ze skleněných sklíček nebo čipů, které jsou potaženy až stovkami specifických oligonukleotidových sond, tyto sondy jsou chemicky syntetizované jako krátké sekvence v rozsahu od 25 do 80 páru bazí (Law et al., 2015). Cílová molekula, která má být analyzována (DNA nebo protein) je označena a hybridizována rozpoznávacími sondami. Signál generovaný vázaným označeným cílem umožňuje identifikaci na základě známých umístění sond. Oligonukleotidové mikročipy jsou široce používány také pro analýzu genové exprese (Rasooly & Herold 2008). Tyto čipy jsou schopné detekce na kvantitativní i kvalitativní úrovni. Navíc umožňují sledovat až několik stovek úseků DNA v jedné reakci (Šťásková et al. 2012).

Lee et al. (2008) představili biočip, který dokáže detekovat tyto mastitidní patogeny: *Corynebacterium bovis*, *Mycoplasma bovis*, *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus spp.*, *Str. agalactiae*, *Str. bovis*, *Str. dysgalactiae* a *Str. uberis*. Detekce se skládá ze čtyř základních kroků-extrakce DNA, PCR, hybridizace DNA a kolorimetrické reakce.

Tyto metody ale zatím nejsou vyvinuty tak, aby splňovaly zásadní požadavky pro detekci mastitidních patogenů. Jejich časová a technická náročnost nalézají výraznější uplatnění ve výzkumných laboratořích (El-Sayed et al. 2017).

3.9 Srovnání kultivačních a molekulárně genetických metod

V současné době se za nejpoužívanější molekulárně genetickou metodu v rámci detekce mastitidy považuje právě PCR. Umožňuje výrazně rychlejší a citlivější výsledek než kultivace. Zároveň má také možnost identifikovat různé druhy v závislosti na použitém druhu primeru (Salina et al. 2020). Koskinen et al. (2009) uvádějí ve svém výzkumu až 100% přesnost detekce pomocí PCR, Gillespie & Oliver (2005) uvádějí přesnost qPCR metody 96,4 %. Molekulárně genetické metody umožňují detekovat bakterie během několika hodin (Gillespie & Oliver 2005). Oproti tomu standardní konvenční mikrobiologické a biochemické metody vyžadují více než 72 hodin (Amin & Hamouda 2011).

Snad největší výhodou diagnostických testů založených na detekci DNA je, že tyto metody se zaměřují spíše na jedinečné složení nukleových kyselin bakteriálního genomu než na fenotypovou expresi produktů, které nukleové kyseliny kódují. Proto identifikační testy založené na přítomnosti DNA podléhají nesmírné variabilitě ve srovnání s diagnostickými metodami založenými na fenotypové charakterizaci. Identifikační systémy založené na DNA jsou zaměřeny na specifické patogeny, umožňují rychlý screening velkého počtu patogenů současně a poskytují definitivní potvrzení patogenů (Gillespie & Oliver 2005).

Nicméně s testováním mastitidních patogenů pomocí PCR je spojeno i několik problémů. Například amplifikované vzorky *S. agalactiae* a *S. dysgalactiae* se liší pouze o cca 6 bp, což je v případě vizualizace na agarózovém gelu nerozeznatelné. Řešením je použití polyakrylamidových gelů (Phuektes et al. 2001), protože má vyšší dělicí schopnost (Zvárová et al. 2012). Jelikož mastitidu může způsobovat až 130 různých druhů mikroorganismů a molekulární metody lze použít jen na ty, na které byly navrženy primery, v tomto ohledu je výhodnější použití kultivačních metod – ty mohou identifikovat většinu druhů (Phuektes et al. 2001).

Negativní kultura může být výsledkem reziduálních antibiotik po antibiotické terapii nebo nízkého počtu patogenů ve vzorku (Gillespie & Oliver 2005). Ve vzorcích obsahujících více než jeden patogen může jeden bakteriální druh potlačit růst jiných druhů. Některé bakteriální druhy navíc vyžadují delší dobu pro svůj růst, například *Mycoplasma* (Ashraf & Imran 2018). Také může docházet k tomu, že některé bakterie v kultivačním médiu nerostou vůbec (Taponen et al. 2009).

Naopak molekulárně geneticky založené metody jsou schopné zachytit infekci i v raném stádiu. Výhodou multiplex PCR v porovnání s konvenční PCR je efektivita nákladů. Vykazuje vyšší citlivost při detekci *S. aureus* a *S. uberis*. Z těchto důvodů je vhodnější pro rutinní diagnostiku (Phuektes et al. 2001).

Screening bakteriálních původců mastitid metodou multiplex qPCR, který zahrnuje identifikaci minimálně 15 bakteriálních patogenů, se může vyšplhat až na částku 1000 Kč/vzorek. V případě PCR testu, který nabízí identifikaci pouze jednoho konkrétního patogenu, například *Mycoplasma bovis* – cena činí 550 Kč/vzorek. (Státní veterinární ústav Jihlava 2020).

4 Závěr

Správná a pohotová diagnostika mastitidy je nesmírně důležitá nejen pro kontrolu a prevenci mastitid, ale také pro zajištění zdravotně nezávadného mléka a mléčných výrobků na trhu. Včasná identifikace patogenů je také významným faktorem v následné antibiotické léčbě. U klinické mastitidy platí, že čím dříve je léčba zahájena, tím je také úspěšnější. Mastitidu může způsobovat hned několik patogenních mikroorganismů. Nejčastěji se však vyskytují *Streptococcus aureus* a *Staphylococcus uberis*.

Řada studií uvádí, že pokud se do detekce mastitid a identifikace patogenů, které ji způsobují investuje vyšší částka, než je tomu v převážné většině doposud, mohlo by se tak předejít značnému rozšíření právě obávanému subklinickému typu mastitidy. Co se týká stájových testů jako orientační, ale především rychlé detekce, své uplatnění najdou jak na malých farmách, tak ve větších provozech.

Přestože jsou tradiční kultivační metody diagnostiky stále považovány za zlatý standard při identifikaci mikroorganismů v souvislosti s mastitidou, vykazují hned několik nedostatků, z nichž nejvýznamnější je relativně dlouhá doba analýzy. Navíc mohou vykazovat falešně negativní výsledky, což může v rámci subklinické mastitidy znamenat ohrožení pro celé stádo. I díky tomu se začínají dostávat do popředí zájmu molekulárně genetické metody, které nabízejí o poznání rychlejší dobu analýzy a mnohem citlivější výsledky. Na druhou stranu, metody založené na identifikaci DNA mají značnou nevýhodu, která je pro některé farmy rozhodující, a to je cena. Ta se v případě qPCR testu pohybuje okolo 1000 Kč/vzorek. Aby byly tyto metody cenově dostupnější, dochází k jejich neustálému zdokonalování. Cílem tohoto vývoje je nejen snížení nákladů na provedení, ale také zjednodušení těchto metod, a to proto, aby bylo v budoucnu možné tyto metody provádět přímo na farmách bez nutnosti převozu vzorků do laboratoří.

5 Seznam použité literatury

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) 1746-6148. doi:10.1186/s12917-016-0905-3

Aebi, M., Bodmer, M., Frey, J., Pilo, P. 2012. Herd-specific strains of *Mycoplasma bovis* in outbreaks of mycoplasmal mastitis and pneumonia. *Veterinary Microbiology*. 157(3-4), 363-368 doi: 10.1016/j.vetmic.2012.01.006

Alnakip, M.E.A., Rhouma, N.R., Abd-Elfatah, E.N., Quintela-Baluja, M., Böhme, K., Fernández-No, I., Bayoumi, M.A., Abdelhafez, M.M., Taboada-Rodríguez, A., Calo-Mata, P., Barros-Velázquez, J. 2020. Discrimination of major and minor streptococci incriminated in bovine mastitis by MALDI-TOF MS fingerprinting and 16S rRNA gene sequencing. *Research in Veterinary Science*. 132, 426-438 doi: 10.1016/j.rvsc.2020.07.027

Amin, A. S., R. H. Hamouda. 2011. PCR Assays for Detecting Major Pathogens of Mastitis in Milk Samples. *World Journal of Dairy & Food Sciences*. 2011(6), 199-206

Anonymous 1. Polymerázová řetězová reakce (PCR). *LabGuide* [online]. 2019 [cit. 2021-04-23]. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/pcr/>

Anonymous 2. ELISA technical guide and protocols. *Thermofisher* [online]. [cit. 2021-04-30]. Dostupné z: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TR0065-ELISA-guide.pdf>

Ashraf, A., Imran, M., 2018. Diagnosis of bovine mastitis: from laboratory to farm. *Tropical Animal Health and Production*, 50(6), 1193-1202 doi:10.1007/s11250-018-1629-0

Awadallah, M. A., Ahmed, H. A., Merwad, A. M., & Selim, M. A. 2016. Occurrence, genotyping, shiga toxin genes and associated risk factors of *E. coli* isolated from dairy farms, handlers and milk consumers. *The Veterinary Journal*, 217, 83–88. doi: 10.1016/j.tvjl.2016.09.014

Aydin, S. 2015. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4–15. doi: 10.1016/j.peptides.2015.04.012

Bagnicka, E., Kawecka-Grochocka E., Pawlina-Tyszko K., Zalewska M., Kapusta A., Kościuczuk E., Marczak S., Ząbek T. 2021. MicroRNA expression profile in bovine mammary gland parenchyma infected by coagulase-positive or coagulase-negative staphylococci. *Veterinary Research* 52(1), 1-20 doi:10.1186/s13567-021-00912-2

Bach, K.D., Barbano D. M., Mcart J. A. A. 2021. The relationship of excessive energy deficit with milk somatic cell score and clinical mastitis. *Journal of Dairy Science* 2021, 104(1), 715-727 doi:10.3168/jds.2020-18432

Baral, S., Kumar Nanda, D., Lowy, D. A., Mátyás, B. 2020. Risk and benefits of consuming raw (unpackaged) and pasteurized (packaged) milk. *DRC Sustainable Future: Journal of Environment, Agriculture, and Energy* 1(1), 23-32 doi:10.37281/DRCSF/1.1.4

Baria s. r. o. Metoda ELISA: aspekty jednotlivých uspořádání. Baria s. r. o. [online]. 2019 [cit. 2021-04-22]. Dostupné z: <https://www.baria.cz/blog/metoda-elisa-aspekty-jednotlivych-usporadani/>

Barkema, H.W., Schukken, Y.H., Zadoks, R.N. 2006. Invited Review: The Role of Cow, Pathogen, and Treatment Regimen in the Therapeutic Success of Bovine *Staphylococcus aureus* Mastitis. *Journal of Dairy Science* 89, 1877–1895. doi:10.3168/jds.s0022-0302(06)72256-1

Bentley Czech s. r.o. Detekce mastitidy – určení Amyloidu A v mléce. Bentley Czech s. r. o. [online]. 2013 [cit. 2021-04-22]. Dostupné z: <https://www.bentleyczech.cz/laboratorni-pristroje/analyza-mlecnych-slozek/154-detekce-mastitidy-urceni-amyloidu-a-v-mlece>

Bouška, J., et al. 2006. Chov dojeného skotu. Praha: Profi Press. ISBN 80-86726-16-9.

Bradley, A.J. 2002. Bovine Mastitis: An Evolving Disease. *The Veterinary Journal* 164(2), 116-128 doi:10.1053/tvjl.2002.0724

Brennecke, J., Falkenberg, U., Wentz, N., Krömker, V., 2021. Are Severe Mastitis Cases in Dairy Cows Associated with Bacteremia? *Animals* 11, 410, 1-9 doi:10.3390/ani11020410

Bustin, S.A et al. 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* 55, 611–622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797

Calonzi, D., Romano, A., Monistero, V., Moroni, P., Luini, M.V., Biscarini, F., Castiglioni, B., Cremonesi, P. 2020. Technical note: Development of multiplex PCR assays for the molecular characterization of *Streptococcus uberis* strains isolated from bovine mastitis. *Journal of Dairy Science* 103, 915–921. doi:10.3168/jds.2019-16823

Carbonnelle, E., Mesquita, C., Bille, E., Day, N., Dauphin, B., Beretti, J.-L., Ferroni, A., Gutmann, L., Nassif, X. 2011. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical Biochemistry* 44, 104–109. doi:10.1016/j.clinbiochem.2010.06.017

Caria, M., Chessa, G., Murgia, L., Todde, G., Pazzona, A. 2016. Development and test of a portable device to monitor the health status of Sarda breed sheep by the measurement of the milk electrical conductivity. *Italian Journal of Animal Science* 15, 275–282. doi:10.1080/1828051x.2016.1149742

Center for Molecular Biology of RNA. 2021. RNA Secondary Structure Files. [online]. 2021 [cit. 2021-04-30]. Dostupné z: http://rna.ucsc.edu/rnacenter/xrna/xrna_gallery.html.

Clarridge, J.E. 2004. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews* 17, 840–862. doi:10.1128/cmr.17.4.840-862.2004

Cremonesi, P., Castiglioni, B., Malferrari, G., Biunno, I., Vimercati, C., Moroni, P., Morandi, S., Luzzana, M. 2006. Technical Note: Improved Method for Rapid DNA Extraction of Mastitis Pathogens Directly from Milk. *Journal of Dairy Science* 89, 163–169. doi:10.3168/jds.s0022-0302(06)72080-x

De Arauz, L.J., Jozala, A.F., Baruque-Ramos, J., Mazzola, P.G., Pessoa, A., Penna, T.C.V. 2012. Culture medium of diluted skimmed milk for the production of nisin in batch cultivations. *Annals of Microbiology* 62, 419–426. doi:10.1007/s13213-011-0278-6

Ding, J., Li, S., Jiang, L., Li, Y., Zhang, X., Song, Q., Hayat, M.A., Zhang, J.-T., Wang, H. 2020. Lamellar Inflammation Responses in the Oligofructose Overload Induced Model of Bovine Laminitis. *Frontiers in Veterinary Science* 7. doi:10.3389/fvets.2020.00351

Duarte, C.M., Freitas, P.P., Bexiga, R. 2015. Technological advances in bovine mastitis diagnosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 27, 665–672. doi:10.1177/1040638715603087

Ďuráčová, M., Klimentová, J., Fučíková, A., Dresler, J. 2018. Proteomic Methods of Detection and Quantification of Protein Toxins. *Toxins* 10(3), 1-30. doi:10.3390/toxins10030099

El-Sayed, A., Awad, W., Abdou, N.-E., Castañeda Vázquez, H. 2017. Molecular biological tools applied for identification of mastitis causing pathogens. *International Journal of Veterinary Science and Medicine* 5, 89–97. doi: 10.1016/j.ijvsm.2017.08.002

Evropský parlament a Rada Evropské unie. 2004. Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu. In: *Sbírka zákonů České republiky, 2004, číslo 853*. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:02004R0853-20141117&from=HU>

Feligini, M., G. Bongioni, E. Brambati, A. Amadesi, C. Cambuli, S. Panelli, C. Bonacina, A. Galli. 2014. Real-time qPCR is a powerful assay to estimate the 171 R/Q alleles at the PrP locus directly in a flock's raw milk: A comparison with the targeted next-generation sequencing. *Journal of Virological Methods*. 207, *Journal of Virological Methods*, 210-214. doi: 10.1016/j.jviromet.2014.07.017

Ferronato, J.A., Ferronato, T.C., Schneider, M., Pessoa, L.F., Blagitz, M.G., Heinemann, M.B., Della Libera, A.M.M.P., Souza, F.N. 2018. Diagnosing mastitis in early lactation: use of Somaticell®, California mastitis test and somatic cell count. *Italian Journal of Animal Science*. 17, 723–729. doi:10.1080/1828051x.2018.1426394

- Fufa, A., Gemechis, F., Bekele M., Alemayehu, A. 2013. Bovine Mastitis: Prevalence, Risk Factors and Bacterial Isolation in Small-Holder Dairy Farms in Addis Ababa City, Ethiopia. *Global Veterinaria*. (10), 647-657. doi:10.5829/idosi.gv.2013.10.6.7349
- Galal Abdel Hameed, K., Sender, G., Korwin – Kossakowska. 2007. Public health hazard due to mastitis in dairy cows. *Animal Science Papers and Reports*. 25 (2), 73-85.
- Gáspárdy, A., Ismach, G., Bajcsy, Á., Gyula Veress, G., Márkus, S., Kpmlósi, I. 2012. Evaluation of the on-line electrical conductivity of milk in mastitic dairy cows. *Acta Veterinaria Hungarica*. 60(1), 145–155. doi:10.1556/avet.2012.012
- Gillespie, B.E., Oliver, S. P. 2005. Simultaneous Detection of Mastitis Pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus agalactiae* by Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Journal of Dairy Science*. 88(10), 3510-3518. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)73036-8
- Glick, B. R., Patten, Ch., L. 2017. *Molecular biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*. 5th ed. Washington, DC: ASM Press. ISBN 978-1-55581-936-1.
- Green, M., R., Sambrook, J. 2018. Hot Start Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*. 2018(5), 1-4. doi:10.1101/pdb.prot095125
- Günther, J., Czabanska, A., Bauer, I., Leigh, J.A., Holst, O., Seyfert, H.-M. 2016. *Streptococcus uberis* strains isolated from the bovine mammary gland evade immune recognition by mammary epithelial cells, but not of macrophages. *Veterinary Research* 47, 1-14. doi:10.1186/s13567-015-0287-8
- Hertl, J.A. et al. 2010. Effects of clinical mastitis caused by gram-positive and gram-negative bacteria and other organisms on the probability of conception in New York State Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 93(4), 1551-1560 doi:10.3168/jds.2009-2599
- Hiitiö, H., Pyörälä, S., Taponen, S., Rajala-Schultz, P., Simojoki, H. 2018. Elimination of experimentally induced bovine intramammary infection assessed by multiplex real-time PCR and bacterial culture. *Journal of Dairy Science* 101, 5267–5276. doi:10.3168/jds.2017-13939
- Hogan, J., Larry Smith, K. 2003. Coliform mastitis. *Veterinary Research* 34, 507–519. doi:10.1051/vetres:2003022
- Hogeveen, H., Huijps, K., Lam, T. 2011. Economic aspects of mastitis: New developments. *New Zealand Veterinary Journal* 59, 16–23. doi:10.1080/00480169.2011.547165
- Hoof, K., Tutenel, A., Zutter, L., Hoof, J., Vandamme, P. 2000. Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection and identification of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter skirrowii*. *FEMS Microbiology Letters* 193, 89–94. doi:10.1111/j.1574-6968.2000.tb09407.x

Jadhav, P.V., Tarate, S.B., Bhuvana, M., Das, D.N., Shome, B.R. 2016. Somatic cell count as a monitoring system for hygienic milk production in India: A review. *Asian Journal of Dairy and Food Research* 35, 270-277. doi:10.18805/ajdfr.v35i4.6624

Jaeger, S., Virchow, F., Torgerson, P.R., Bischoff, M., Biner, B., Hartnack, S., Rüegg, S.R. 2017. Test characteristics of milk amyloid A ELISA, somatic cell count, and bacteriological culture for detection of intramammary pathogens that cause subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science* 100, 7419–7426. doi:10.3168/jds.2016-12446

Kaczorek-Łukowska, E., J. Małaczewska, R. Wójcik, K. Naumowicz, A. Blank a A. K. Siwicki. 2021. Streptococci as the new dominant aetiological factors of mastitis in dairy cows in north-eastern Poland: analysis of the results obtained in 2013–2019. *Irish Veterinary Journal*. 74(1), 1-6. doi:10.1186/s13620-020-00181-z

Keefe, G. 2012. Update on Control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for Management of Mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 28(2), 203-216. doi: 10.1016/j.cvfa.2012.03.010

Kester, H.J., Sorter, D.E., Hogan, J.S. 2015. Activity and milk compositional changes following experimentally induced *Streptococcus uberis* bovine mastitis. *Journal of Dairy Science* 98, 999–1004. doi:10.3168/jds.2014-8576

Kočárek, E. 2007. *Molekulární biologie v medicíně*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně. ISBN 978-80-7013-450-4.

Koskinen, M.T., et al. 2009. Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science* 92(3), 952-959. doi:10.3168/jds.2008-1549

Krpálková, L., Kvapilík, J., Cabrera, V. E., Burdych J. 2016. Associations of reproduction and health with the performance and profit of dairy cows. *Agriceon* 2016(62), 499-508. doi:10.17221/176/2015

Lakew, B. T., Fayera, T., Ali, Y. M. 2019. Risk factors for bovine mastitis with the isolation and identification of *Streptococcus agalactiae* from farms in and around Haramaya district, eastern Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production* 51(6), 1507-1513. doi:10.1007/s11250-019-01838-w

Lakshmi, R., Jayavardhanan, K. K. 2016. Screening of milk samples for sub-clinical and clinical mastitis by using CMT and SCC. *Journal of Medical Science And clinical Research* 2016(4), 10853-10855. doi:10.18535/jmscr/v4i6.27

Law, J.W.-F., Ab Mutalib, N.-S., Chan, K.-G., Lee, L.-H. 2015. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Frontiers in Microbiology* 5(770), 1-19. doi:10.3389/fmicb.2014.00770

- Le Maréchal, C., et al. 2011. Molecular Basis of Virulence in *Staphylococcus aureus* Mastitis. *Plos One* 6(11), 1-10. doi: 10.1371/journal.pone.0027354
- Lee, P.Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y., Kim, Y.H. 2012. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments* 2012(62), 1-5. doi:10.3791/3923
- Lee, K.-H., Lee, J.-W., Wang, S.-W., Liu, L.-Y., Lee, M.-F., Chuang, S.-T., Shy, Y.-M., Chang, C.-L., Wu, M.-C., Chi, C.-H. 2008. Development of a Novel Biochip for Rapid Multiplex Detection of Seven Mastitis-Causing Pathogens in Bovine Milk Samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 20, 463–471. doi:10.1177/104063870802000408
- Martin, N.H., Boor, K.J., Wiedmann, M. 2018. Symposium review: Effect of post-pasteurization contamination on fluid milk quality. *Journal of Dairy Science* 101, 861–870. doi:10.3168/jds.2017-13339
- Moretti, R., Soglia, D., Chessa, S., Sartore, S., Finocchiaro, R., Rasero, R., Sacchi, S. 2021. Identification of SNPs Associated with Somatic Cell Score in Candidate Genes in Italian Holstein Friesian Bulls. *Animals* 11(2), 1-11. doi:10.3390/ani11020366
- 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. doi: 10.1016/j.micpath.2017.12.024
- Nagasawa, Y., Kiku, Y., Sugawara, K., Yabusaki, T., Oono, K., Fujii, K., Suzuki, T., Maehana, K., Hayashi, T. 2019. The bacterial load in milk is associated with clinical severity in cases of bovine coliform mastitis. *Journal of Veterinary Medical Science* 81(1), 107-112. doi:10.1292/jvms.18-0581
- Ngassam Tchamba, C., Rao, A.S., Boyen, F., Haesebrouck, F., Duprez, J. -N., Théron, L., Thiry, D., Mainil, J.G. 2019. Comparison of quantitative PCR and MALDI-TOF mass spectrometry assays for identification of bacteria in milk samples from cows with subclinical mastitis. *Journal of Applied Microbiology* 127(3), 683–692. doi:10.1111/jam.14358
- Oliver, S. P., Jayarao, B. M., Almeida, R. A. 2005. Foodborne Pathogens in Milk and the Dairy Farm Environment: Food Safety and Public Health Implications. *Foodborne Pathogens and Disease* 2(2), 115-129. doi:10.1089/fpd.2005.2.115
- Oliver, S. P., Murinda, S. E. 2012. Antimicrobial Resistance of Mastitis Pathogens. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 28(2), 165–185. doi: 10.1016/j.cvfa.2012.03.005
- Opletal, L., Šimerda B. 2017. Přírodní látky a jejich biologická aktivita: 7. Látky ovlivňující mastitidu u hospodářských zvířat. Výzkumný ústav živočišné výroby v.v.i., Praha-Uhřetěves [online]. 1-57. [cit. 2021-3-16]. Dostupné z: https://vuzv.cz/wp-content/uploads/2018/01/Opletal_Mastitidy2017.pdf

- Pan, Z., Zhou, Q., Ma, H., Gong, Q., Wang, S., Yao, H., Ma, J., Wang, K. 2020. Identification of a novel bacterial taxon associated with bovine mastitis showing a close evolutionary relationship with *Elizabethkingia* sp. *Microbiological Research* **236**(236), 1-8. doi: 10.1016/j.micres.2020.126443
- Parin, U., Kirkan, Ş., Çicek, E., Yüksel, H. T. 2017. Detection of Virulence Genes in *Streptococcus uberis* Isolated from Bovine Mastitis in Aydın Province by Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın* 2017(31), 213-219.
- 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, 588–596. doi:10.1017/s1751731119002210
- Persson Waller, K., Lundberg, Å., Nyman, A.-K., 2021. Risk and success factors for good udder health of early lactation primiparous dairy cows. *Journal of Dairy Science* 104, 4858–4874. doi:10.3168/jds.2020-19683
- Phuektes, P., Mansell, P.D., Browning, G.F. 2001. Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay for Simultaneous Detection of *Staphylococcus aureus* and Streptococcal Causes of Bovine Mastitis. *Journal of Dairy Science* 84, 1140–1148. doi:10.3168/jds.s0022-0302(01)74574-2
- Pinedo, P., Santos, J.E.P., Chebel, R.C., Galvão, K.N., Schuenemann, G.M., Bicalho, R.C., Gilbert, R.O., Rodriguez-Zas, S.L., Seabury, C.M., Rosa, G., Thatcher, W. 2020. Associations of reproductive indices with fertility outcomes, milk yield, and survival in Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 103, 6647–6660. doi:10.3168/jds.2019-17867
- Raemy, A., Meylan, M., Casati, S., Gaia, V., Berchtold, B., Boss, R., Wyder, A., Graber, H.U. 2013. Phenotypic and genotypic identification of streptococci and related bacteria isolated from bovine intramammary infections. *Acta Veterinaria Scandinavica* 55(1), 1-9. doi:10.1186/1751-0147-55-53
- Rainard, P., Foucras, G., Boichard, D., Rupp, R. 2018. Invited review: Low milk somatic cell count and susceptibility to mastitis. *Journal of Dairy Science* 101, 6703–6714. doi:10.3168/jds.2018-14593
- Rasooly, A., Herold, K.E. 2008. Food Microbial Pathogen Detection and Analysis Using DNA Microarray Technologies. *Foodborne Pathogens and Disease* 5, 531–550. doi:10.1089/fpd.2008.0119
- Rosypal, S., Doškař, J., Petrzik, K., Růžičková, V. 2005. Úvod do molekulární biologie. 4., (inovované) vyd. Brno: Stanislav Rosypal, 2005. ISBN 80-902562-5-2.
- Ruegg, P.L. 2021. What Is Success? A Narrative Review of Research Evaluating Outcomes of Antibiotics Used for Treatment of Clinical Mastitis. *Frontiers in Veterinary Science* 8(8), 1-14. doi:10.3389/fvets.2021.639641

- Salina, A., Timenetsky, J., Barbosa, M.S., Azevedo, C.M., Langoni, H. 2020. Microbiological and molecular detection of *Mycoplasma bovis* in milk samples from bovine clinical mastitis. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 40, 82–87. doi:10.1590/1678-5150-pvb-6259
- 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, 31–45. doi:10.1016/s0378-4320(03)00133-7
- Sedky, D., A. Ghazy, A., A. Soliman, N., M. Shaapan, R. 2020. Comparative Diagnosis of Infectious Bacteria in Bovine Milk. *Journal of Animal Health and Production* 8(4), 171-182. doi: 10.17582/journal.jahp/2020/8.4.171.182
- Shafi, T. A., Bansal, B. K., Sharma, S., Gupta, D. K., Singh, R. 2021. The molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* of bovine mastitis origin. *Veterinarski arhiv* 91(1), 1-10. doi: 10.24099/vet.arhiv.0808
- Shang, F., Wang, H., Xue, T., 2020. Anti-Biofilm Effect of Tea Saponin on a *Streptococcus agalactiae* Strain Isolated from Bovine Mastitis. *Animals* 10 (9), 1-9. doi:10.3390/ani10091713
- 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, 429–438. doi:10.5713/ajas.2011.10233
- Scherpenzeel, C.G.M., Den Uijl, I.E.M., Van Schaik, G., Olde Riekerink, R.G.M., Keurentjes, J.M., Lam, T.J.G.M. 2014. Evaluation of the use of dry cow antibiotics in low somatic cell count cows. *Journal of Dairy Science* 97, 3606–3614. doi:10.3168/jds.2013-7655
- Schmidt, T., Kock, M.M., Ehlers, M.M. 2015. Diversity and antimicrobial susceptibility profiling of staphylococci isolated from bovine mastitis cases and close human contacts. *Journal of Dairy Science* 98, 6256–6269. doi:10.3168/jds.2015-9715
- Schukken, Y., Chuff, M., Moroni, P., Gurjar, A., Santisteban, C., Welcome, F., Zadoks, R. 2012. The “Other” Gram-Negative Bacteria in Mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 28, 239–256. doi: 10.1016/j.cvfa.2012.04.001
- Silva, A. T. F., Silva, J. G. D., Aragao, B. B., Núbia Michelle Vieira da Silva, N. M. V. D., Vasconcelos, P. C., Oliveira, C. J. B. D., Mota, R. A. 2021. Genetic traceability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from primiparous dairy cows mastitis, humans and environment in the Northeast region of Brazil. *Ciência Rural* 51(4), 1-7. doi:10.1590/0103-8478cr20200679
- Soler, L., García, N., Andrés, M., Armengol R., Lampreave, F., Alava, M. A., Piñeiro, M. 2019. Development and validation of an ELISA for the quantification of bovine ITIH4 in serum and milk. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 217, 1-6. doi: 10.1016/j.vetimm.2019.109922

Státní veterinární ústav Jihlava [online]. 2020 [cit. 2021-04-23]. Dostupné z: <https://www.svujihlava.cz/121-ceniky.html>

Sun, M., Gao, X., Zhao, K., Ma, J., Yao, H., Pan, Z. 2021. Insight Into the Virulence Related Secretion Systems, Fimbriae, and Toxins in O2:K1 *Escherichia coli* Isolated From Bovine Mastitis. *Frontiers in Veterinary Science* 8, 1-14. doi:10.3389/fvets.2021.622725

Šána, J., Slabý, O., Bešše, A., Juráček, J., Lízal, P., Vaňáčková, J., Někviňová, J., Radová, L. 2017. Úvod do molekulární medicíny: cvičení (biomarkerové studie). Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-8538-1.

Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V., Koptíková, J. 2005. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 80-210-3841-1.

Šťásková, Z., Borkovcová, I., Karpíšková, R. 2012. Možnosti detekce Stafylokokových enterotoxinů. *Chemické listy* [online]. (106), 745-749 [cit. 2021-04-22]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012_08_745-749.pdf

Tančin, V., Tančinová, D. 2008. *Strojové dojení kráv a kvalita mlieka*. Nitra: Slovenské centrum poľnohospodárskeho výskumu Nitra. ISBN 978-80-88872-80-1.

Taponen, S., Pyörala, S. 2009. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis—Not so different from *Staphylococcus aureus*? *Veterinary Microbiology* 134, 29–36. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.09.011

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, 2610–2617. doi:10.3168/jds.2008-1729

Tezera, M., Aman Ali, E. 2021. Prevalence and associated risk factors of Bovine mastitis in dairy cows in and around Assosa town, Benishangul-Gumuz Regional State, Western Ethiopia. *Veterinary Medicine and Science* 2021(00), 1-7. doi:10.1002/vms3.454

Thermo Fisher Scientific. Thermo Scientific PathoProof Mastitis Complete-12 assay. Thermo Fisher Scientific [online]. 2014. 2014, 1-20. [cit. 2021-04-22]. Dostupné z: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/TS-Micro-MA-Pathoproof-Complete-Assay-IFU-v3.pdf>

Tomazi, T., Tomazi, A.C.C.H., Silva, J.C.C., Bringhenti, L., Bravo, M.L.M.C., Rodrigues, M.X., Bicalho, R.C. 2021. Immunization with a novel recombinant protein (YidR) reduced the risk of clinical mastitis caused by *Klebsiella* spp. and decreased milk losses and culling risk after *Escherichia coli* infections. *Journal of Dairy Science* 104, 4787–4802. doi:10.3168/jds.2020-19173

- 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), 1-18. doi: 10.1371/journal.pone.0199561
- Tong, J., Zhang, H., Zhang, Y., Xiong, B., Jiang, L. 2019. Microbiome and Metabolome Analyses of Milk From Dairy Cows With Subclinical *Streptococcus agalactiae* Mastitis—Potential Biomarkers. *Frontiers in Microbiology* 10(13), 1-14. doi:10.3389/fmicb.2019.02547
- Villa-Arcila, N.A., Sanchez, J., Ratto, M.H., Rodriguez-Lecompte, J.C., Duque-Madrid, P.C., Sanchez-Arias, S., Ceballos-Marquez, A. 2017. The association between subclinical mastitis around calving and reproductive performance in grazing dairy cows. *Animal Reproduction Science* 185, 109–117. doi: 10.1016/j.anireprosci.2017.08.010
- Wang, Y., Nan, X., Zhao, Y., Jiang, L., Wang, M., Wang, H., Zhang, F., Xue, F., Hua, D., Liu, J., Yao, J., Xiong, B. 2021. Rumen microbiome structure and metabolites activity in dairy cows with clinical and subclinical mastitis. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 12(1), 1-21. doi:10.1186/s40104-020-00543-1
- Watts, G.S., Youens-Clark, K., Slepian, M.J., Wolk, D.M., Oshiro, M.M., Metzger, G.S., Dhingra, D., Cranmer, L.D., Hurwitz, B.L. 2017. 16S rRNA gene sequencing on a benchtop sequencer: accuracy for identification of clinically important bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 123, 1584–1596. doi:10.1111/jam.13590
- Wiebe, M., Pfarrer, C., Górriz Martín, L., Schmicke, M., Hoedemaker, M., Bollwein, H., Heppelmann, M. 2021. In vitro effects of lipopolysaccharides on bovine uterine contractility. *Reproduction in Domestic Animals* 56, 172–182. doi:10.1111/rda.13862
- Wieser, A., Schneider, L., Jung, J., Schubert, S. 2012. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review). *Applied Microbiology and Biotechnology* 93, 965–974. doi:10.1007/s00253-011-3783-4
- Windria, S., Salasia, S.I.O., Nugroho, W., Widayanti, R., Indarjulianto, S. 2021. Development of ELISA against milk haptoglobin for diagnosis of subclinical mastitis in goats. *Heliyon* 7(2), 1-7. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e06314
- Wolfová, M., Wolf, J., Kvapilík, J., Kica, J. 2007. Selection for Profit in Cattle: I. Economic Weights for Purebred Dairy Cattle in the Czech Republic. *Journal of Dairy Science* 90(5), 2442-2455. doi:10.3168/jds.2006-614
- Zavadilová, L. 2017. Genetické korelace mezi výskytem klinické mastitidy, chorob a poruch paznehtů a vybranými produkčními, reprodukčními a funkčními znaky u holštýnského skotu. 2017. Praha, Uhřetěves: Výzkumný ústav živočišné výroby. ISBN 978-80-7403-185-4. ISSN 978-80-7403-185-4.
- 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(8), 1-17. doi:10.3389/fvets.2021.607311

Zvárová, J. et al. 2012. Metody molekulární biologie a bioinformatiky. Praha: Karolinum.Biomedicínská informatika. ISBN 978-80-246-2150-0.