

**Faremní kultivace
v systému kontroly mastitid**

STEP BY STEP

Faremní diagnostiku původců mastitid

A. - neznám

B. – znám, ale na farmě nepoužívám

C. – používám pouze pro určení, zda mastitidu léčit ATB

D. – používám pro identifikaci patogenů a následnou cílenou léčbu

I. Depistáž spektra patogenů

- **PCR - polymerasová řetězová reakce** (polymerase chain reaction)
- Molekulárně biologické vyšetření. Detekce DNA patogenů metodou multiplex real-time PCR. Tato metoda neumožňuje kvantitativní hodnocení.
- Přesné, citlivé (zachytí od 1 kusu živé i mrtvé bakterie)
- Odebírá z bazénu, 500ml mléka sterilně
- Speciální skleněné odběrné nádoby poskytuje a vyšetření v Čechách provádí Státní veterinární ústav Olomouc a Jihlava
- **Tato depistáž se kvalitativně nedá nahradit jakýmkoli množstvím standartně vyšetřovaných vzorků**

Depistáž spektra patogenů

Protokol používaný v Čechách v SVÚ Jihlava a Olomouc

Molekulárně biologické vyšetření. Detekce DNA bakteriálních původců mastitid

Metoda: multiplex real-time PCR

Číslo vzorku

Původce

Výsledek

Staphylococcus aureus

Enterococcus sp.

Corynebacterium bovis

Gen pro s-laktamazu

Escherichia coli

Streptococcus dysgalactiae

Staphylococcus sp

Streptococcus agalactiae

Streptococcus uberis

Klebsiella sp.

Serratia marcescens

Arcanobacterium pyogenes

Používá se SET DG mastitid pro 12 druhů..... 800,- Kč

Extra PCR vyšetření Mycoplasma bovis.....600,- Kč

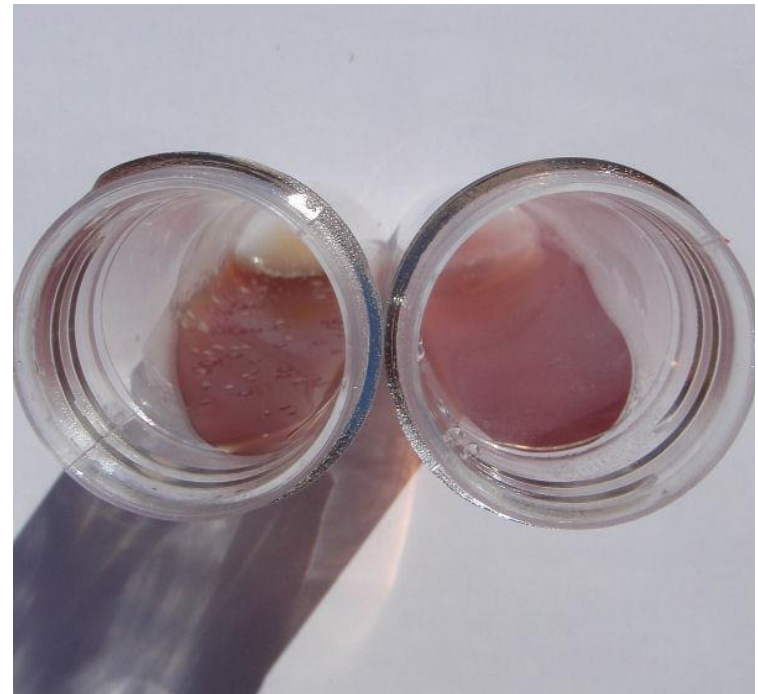
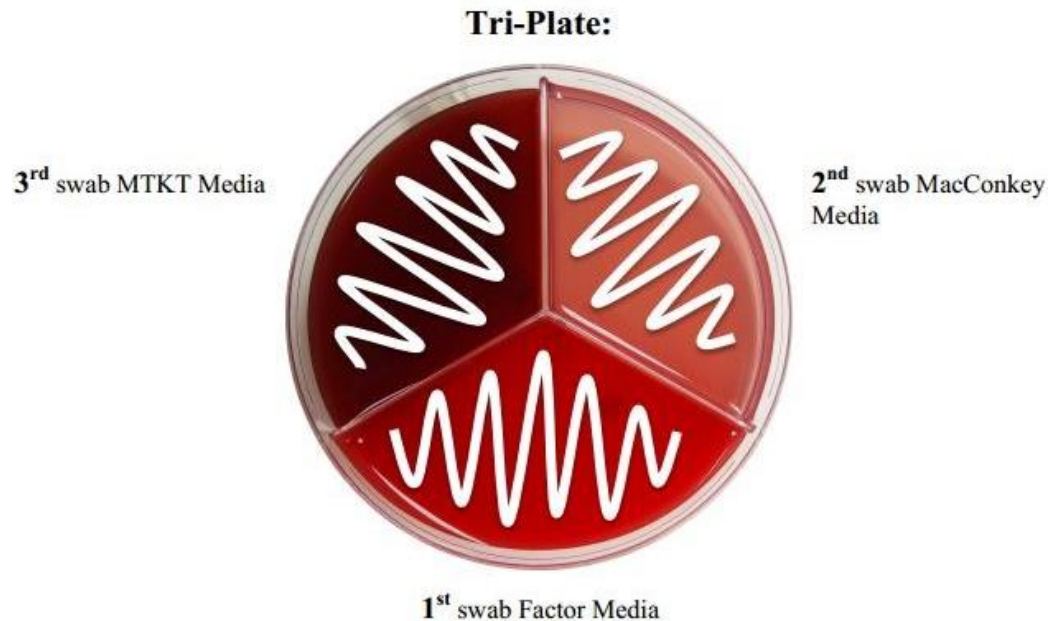
Prothoteca 600,- Kč

Suma.....2000.-Kč

2. Výběr vhodné faremní diagnostiky

Výběr faremní diagnostiky závisí na spektru zachycených patogenů. Pokud se nenajde druh, který vyžaduje přesnou identifikaci z důvodu specifické léčby, můžeme stanovit jednotný protokol léčby a běžný typ faremní diagnostiky (v Čechách se jedná o cca 20% farem).

Příklad:



Co je to protokol léčby mastitid na farmě ?

Způsob léčení mastitid, zahrnuje ATB i další terapeutika

Příklady:

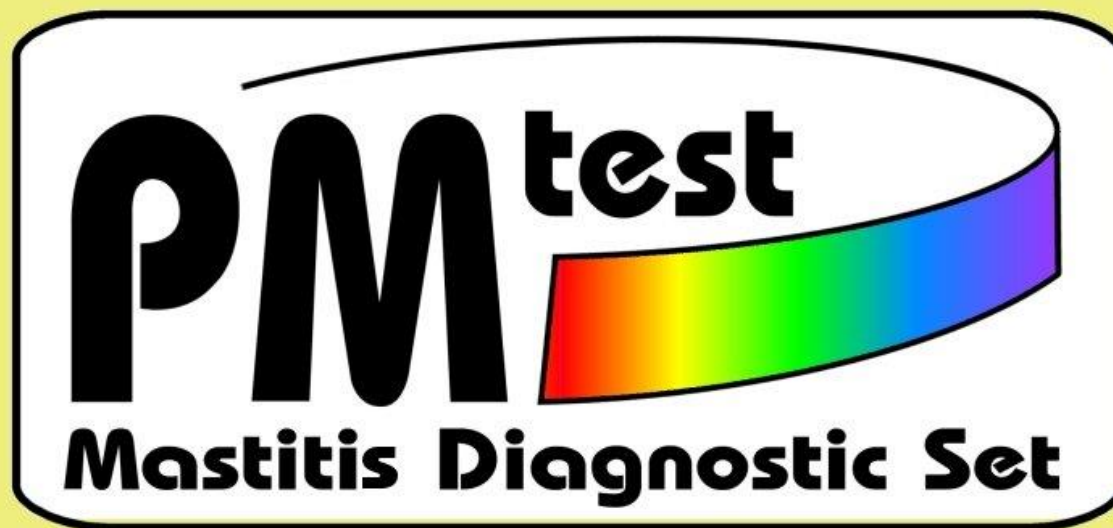
Monoantibiotický PL – zpravidla IMM použití nejnovějšího ATB

Víceantibiotický PL - IMM aplikátory s více synergně působícími ATB

Postupný PL – nejdříve se nasadí levné IMM ATB jako lék první volby, při selhání terapie se aplikuje drahé IMM abt, v případném 3. kole následuje INJ ATB léčba

Cílený PL – nejprve se určí druh patogena, který způsobil mastitidu, poté se na základě známé citlivosti nasadí odpovídající ATB

Výběr vhodné faremní diagnostiky



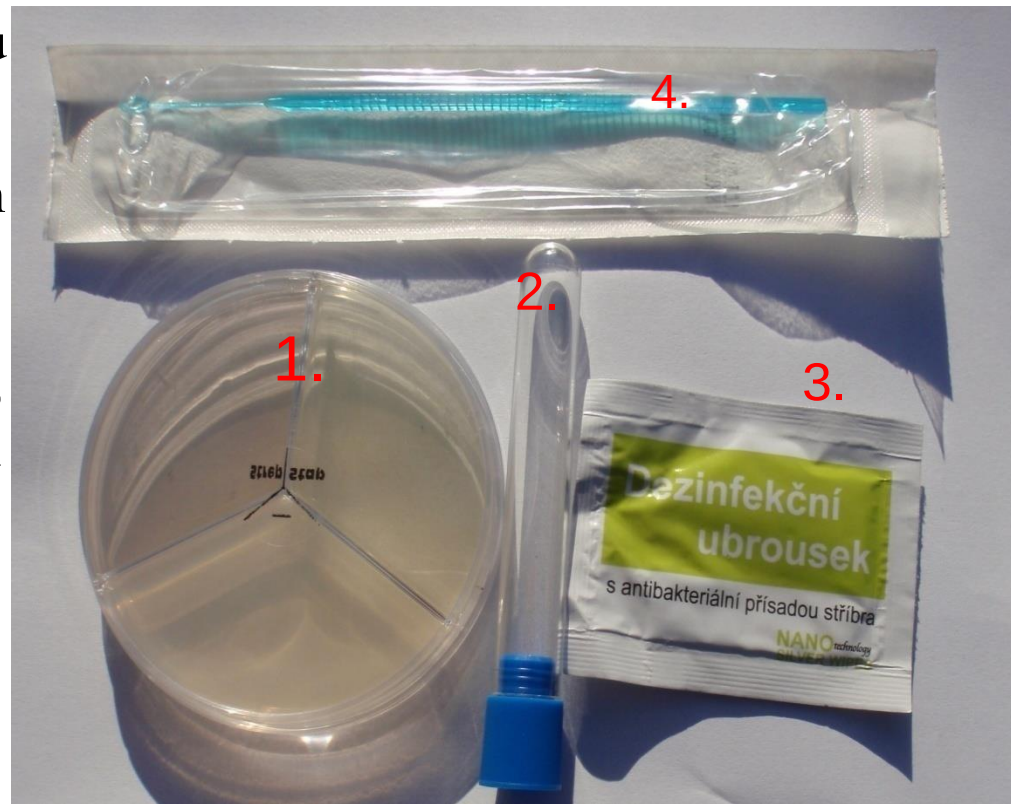
SOUPRAVA PRO RYCHLOU DIAGNOSTIKU PŮVODCE MASTITID U DOJNIC

cílené použití antibiotik při stanovení původce mastitidy a citlivosti k ATB
minimalizace použití antibiotik s indikačním omezením
efektivní práce se stádem dojníc v rámci antimastitidního programu

Výrobce v České republice: LabMediaServis s.r.o., Jaroměř
www.labmediaservis.cz

PM test obsahuje

1. třísektorovou petriho misku se třemi originálními multichromovými agary. Každý sektor misky umožňuje růst jedné skupiny původců mastitid u krav (Streptokoky, Stafolokoky a G- bakterie), zatímco ostatní bakterie jsou inhibovány. **Kolonie jednotlivých druhů bakterií vyrostou ve specifické barvě.**
2. sterilní jednorázovou zkumavku
3. jednorázový dezinfekční tampon pro očištění hrotu struku
4. sterilní jednorázovou kličku pro nanesení vzoru mléka ze zkumavky na povrch agarů v petriho misce.



Cena za 1 PM test 85 Kč,-

Postup provedení PM testu

- Asepticky odebraný vzorek mléka nanese na povrchy všech tří agarů, misku PM testu uzavřeme víčkem a v pozici dnem vzhůru uložíme do inkubátoru.
- Inkubujeme při teplotě $37,5 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ a 55% relativní vlhkosti po 22 (max 28) hodin. Tato doba je dostačující k nárůstu mikrobiálních kolonií ze zárodků přítomných v naneseném vzorku mléka.
- K inkubaci můžeme použít medicínský nebo jiný komerčně dostupný inkubátor, rozhoduje citlivost a udržení požadovaných parametrů.

3. Depistáž zastoupení patogenů v chovu

Zavedení PM testu na farmě musí provést odborník

- identifikuje spektrum patogenů pro konkrétní stádo (při uzavřeném obratu stáda zpravidla 5-10 druhů se stabilním výskytem na farmě)
- určí jejich pořadí dle závažnosti (morbidity, kontagiozita)
- vyhotoví textový a fotografický manuál identifikace patogenů pro navštívenou farmu
- zajistí kontrolu kolonií na MALDITOFU – **bezpodmínečně nutné**
- stanoví citlivosti na antibiotika IN VITRO

Hmotnostní spektrometr MALDI TOF dokáže vzorek bakteriálního kmene odebraného přímo z povrchu PMtestu rozstřelit nanosekundovým laserem na částice vržené do vakua v detektoru, kde se změří jejich rychlost. Ta je úměrná jejich hmotnosti a počítačové vyhodnocení hmotnostních spekter umožňuje identifikaci vzorku z databáze 4000 známých mikroorganismů. Vyšetření v ČR provádí SVÚ Olomouc a Jihlava v ceně cca 50 Kč,-/ vzorek



Depistáž zastoupení patogenů v chovu

- V mléčné žláze více než 200 druhů mikroorganismů, u 100 z nich patogenita
- kvantifikace patogenů mléčné žlázy – nutnost zmapovat výskyt kmenů zachycených PCR metodou
- Odběr vzorků cca 10% krav u stád do 100 kusů a dalších 5% z počtu krav nad 100 kusů
- Min. 5 odstříků před odběrem, aseptický odběr vzorků mléka
- Vzorky mléka pro depistáž se vybírají ze 3 skupin krav:

1. skupina: Dojnice do 3 měsíců po otelení, neléčené v uplynulém týdnu, kterým se mezi předposlední a poslední kontrolou užitkovosti výrazně (cca o 50 - 100%) zvýšil počet buněčných elementů. Odebírají se plné vzorky (full samples) mléka

2. skupina: Dojnice krátce před zasušením, které měly v laktaci opakující se mastitidy nebo mají zvýšený počet buněčných elementů. Odebírají se plné vzorky (full samples) mléka

3. skupina: Dojnice s novou dosud neléčenou mastitidou (počet - co se najde), odebírá se čtvrtový vzorek (quarter sample) z postižené čtvrti.

Depistáž zastoupení patogenů v chovu

Příklady z praxe a výsledky

1. Farma A, 280 ks krav

Skupina 1: 18 kusů dojnic
Skupina 2: 18 kusů dojnic
Skupina 3: eventuální mastitidy

2. Farma B, 490 ks krav

Skupina 1: 30 ks dojnic
Skupina 2: 30 ks dojnic
Skupina 3: eventuální mastitidy

3. Farma C, 90 ks krav

Skupina 1: 10 ks dojnic
Skupina 2: 10 ks dojnic
Skupina 3: eventuální mastitidy

Sestavení protokolů léčby

Co znamená záchyt bakterie *Streptococcus agalactiae* ?

A. – provedu ozdravování chovu vyřazením nakažených dojníc

 po cílené depistáži léčím IMM ATB postižené čtvrti

C. – je nakažlivá, ale potlačí ji zoohygienická opatření na dojárně

D. – neznám, neřeším, nejde o zásadní problém

Mycoplasma

PCR (Mbov) Molekulárně biologickým vyšetřením Real-Time PCR nebyla zjištěna přítomnost DNA Mycoplasma bovis.

Farma A

STEP 2.

Proškolení práce se sety faremní diagnostiky
Primární depistáž na farmě
Ověření nálezů - Maltitof (laboratoř)

Klebsiella oxytoca

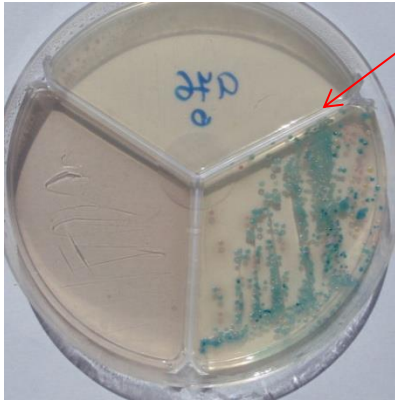


PCR POZITIVNÍ:

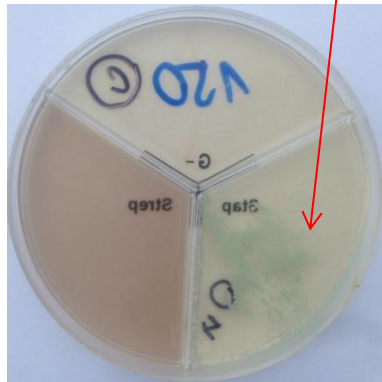
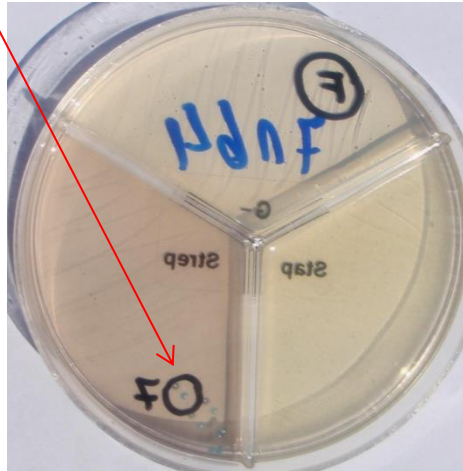
Streptococcus dysgalactiae

Staphylococcus sp.

Streptococcus agalactiae

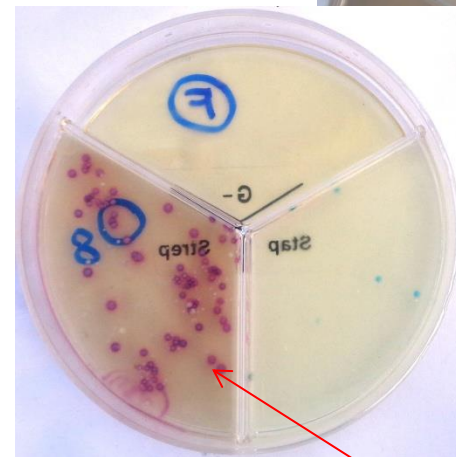
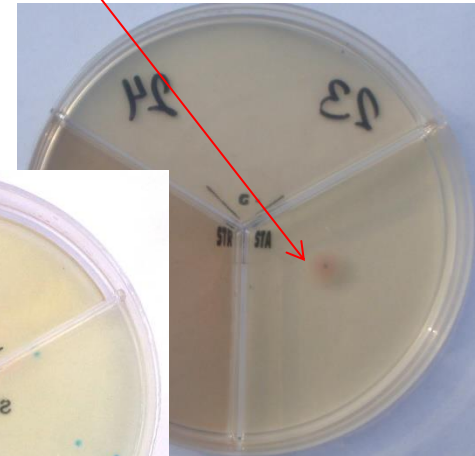


Staphylococcus haemolyticus



Staphylococcus equorum

Bacillus pumilus



Enterococcus faecalis

Streptococcus agalactiae

- Na PM testu roste v světlemodrých koloniích na STR sektoru
- Léčka intramammární, vysoce úspěšná
- Na farmách ČR v současné době méně častý nález



STEP 3.

Sestavení systému kontroly mastitid
Vypracování protokolů léčby

Farma A

SCC přes
800 tisíc

IMM *Chymotripsinum*
3x po 24hod

Patrně
proběhla
G- mastitida

SCC přes
400 tisíc

Mast
6x po 12hod

KONTROLA
UŽITKOVOST

Bez nálezu
patogenů

Nejsou klinické změny

Lokální klinika (čtvrt')

IMM *Prednisolonum*
2-5x po 24hod, mast

Celková klinika (horečka)

Drenč 50l, (INJ ATB)
INJ NSAID 2-5x po 24hod

Kriteria
200 dnů p.p.
SB o 100%

Klebsiella

KNS

Směs KNS

Poškozený
strukový
kanálek

Evidence



Monokultura

S.dysgalactiae

S. agalactiae

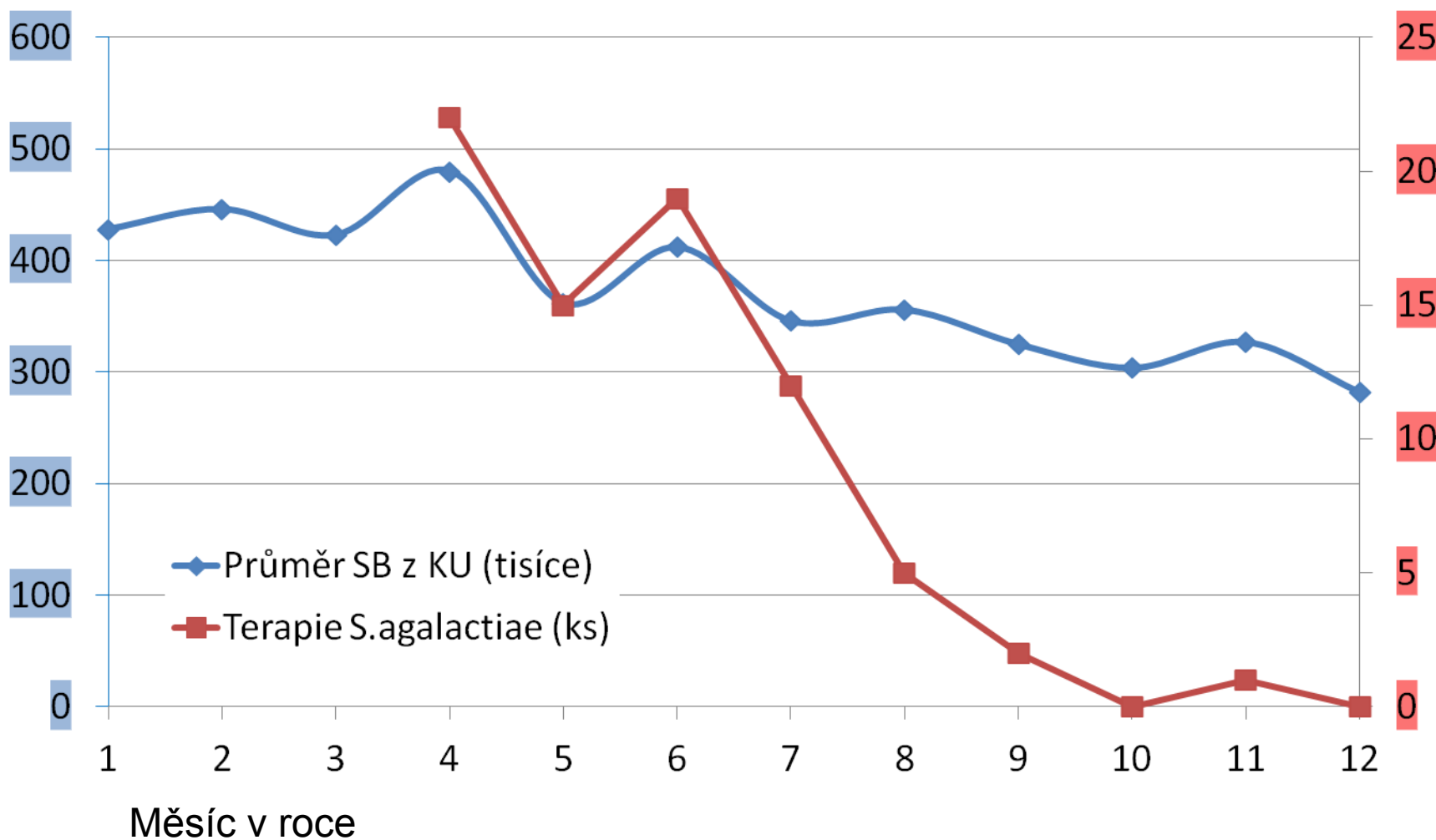
IMM *Amoxicillinum*
3x po 24hod + mast

KLINICKÁ
MASTITIDA

Farma A, mastitidy 2016

	01 201 6	02 2016	03 2016	04 2016	05 2016	06 2016	07 2016	08 2016	09 2016	10 2016	11 2016	12 2016
Brakované krávy (ks)	2	6	5	0	16	2	8	4	7	1	15	2
Průměr SB z KU (tisíce)	428	446	423	480	362	412	346	356	325	304	327	282
Počet PM testů (ks)	-	-	-	72	46	59	38	26	22	16	19	17
ATB terapie S.agalactiae (ks)	?	?	?	22	15	19	12	5	2	0	1	0
ATB terapie S.dysgalactiae	?	?	?	4	3	2	0	1	0	3	1	2
ATB terapie KNS (ks)	?	?	?	8	3	4	5	7	4	7	4	5
ATB terapie E.coli Klebs. , ostatní	18	21	16	2	1	2	5	3	5	2	4	4
Spotřeba ATB ter. mastitid (Kč)	572 0	7436	6136	7592	4368	5642	3536	1768	2132	1300	1690	1508

Farma A, *Streptococcus agalactiae*



Sestavení protokolů léčby

Farma B, 490 krav

Molekulárně biologické vyšetření. Detekce DNA bakteriálních původců mastitid

Metoda: multiplex real-time PCR

Číslo vzorku: xxxxxxxxx

<u>Původce</u>	<u>Výsledek</u>
Staphylococcus aureus	pozitivní
Enterococcus sp.	pozitivní
Corynebacterium bovis	negativní
Gen pro s-laktamazu	negativní
Escherichia coli	pozitivní
Streptococcus dysgalactiae	negativní
Staphylococcus sp.	pozitivní
Streptococcus agalactiae	negativní
Streptococcus uberis	negativní
Klebsiella sp.	negativní
Serratia marcescens	pozitivní
Arcanobacterium pyogenes	negativní

STEP 1.
Vyšetření bazénového vzorku mléka
pomocí metody PCR (SVÚ Jihlava)

Prekultivace

Cíl vyšetření / metoda	vyšetřeno vzorků	negativní	pozitivní	dubiozni
Mycoplasma bovis	1	1	0	0
PCR (Mbov) Molekulárně biologickým vyšetřením Real-Time PCR nebyla zjištěna přítomnost DNA Mycoplasma bovis.				

Farma B

STEP 2.

Proškolení práce se sety faremní diagnostiky
Primární depistáž na farmě
Ověření nálezů - Maltitof (laboratoř)

PCR POZITIVNÍ:

Staphylococcus aureus

Enterococcus sp.

Escherichia coli

Staphylococcus sp.

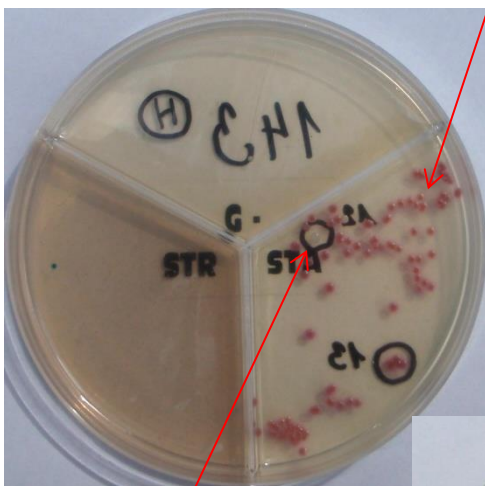
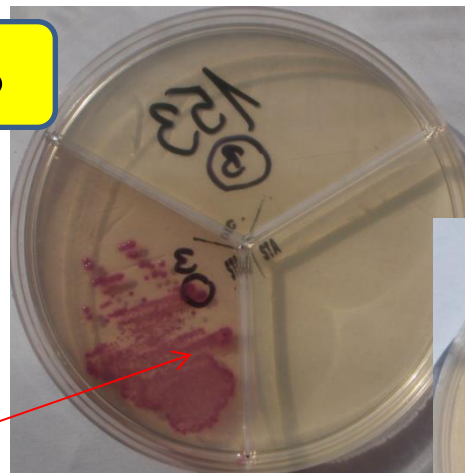
Serratia marcescens

S. chromogenes

Staphylococcus xylosus

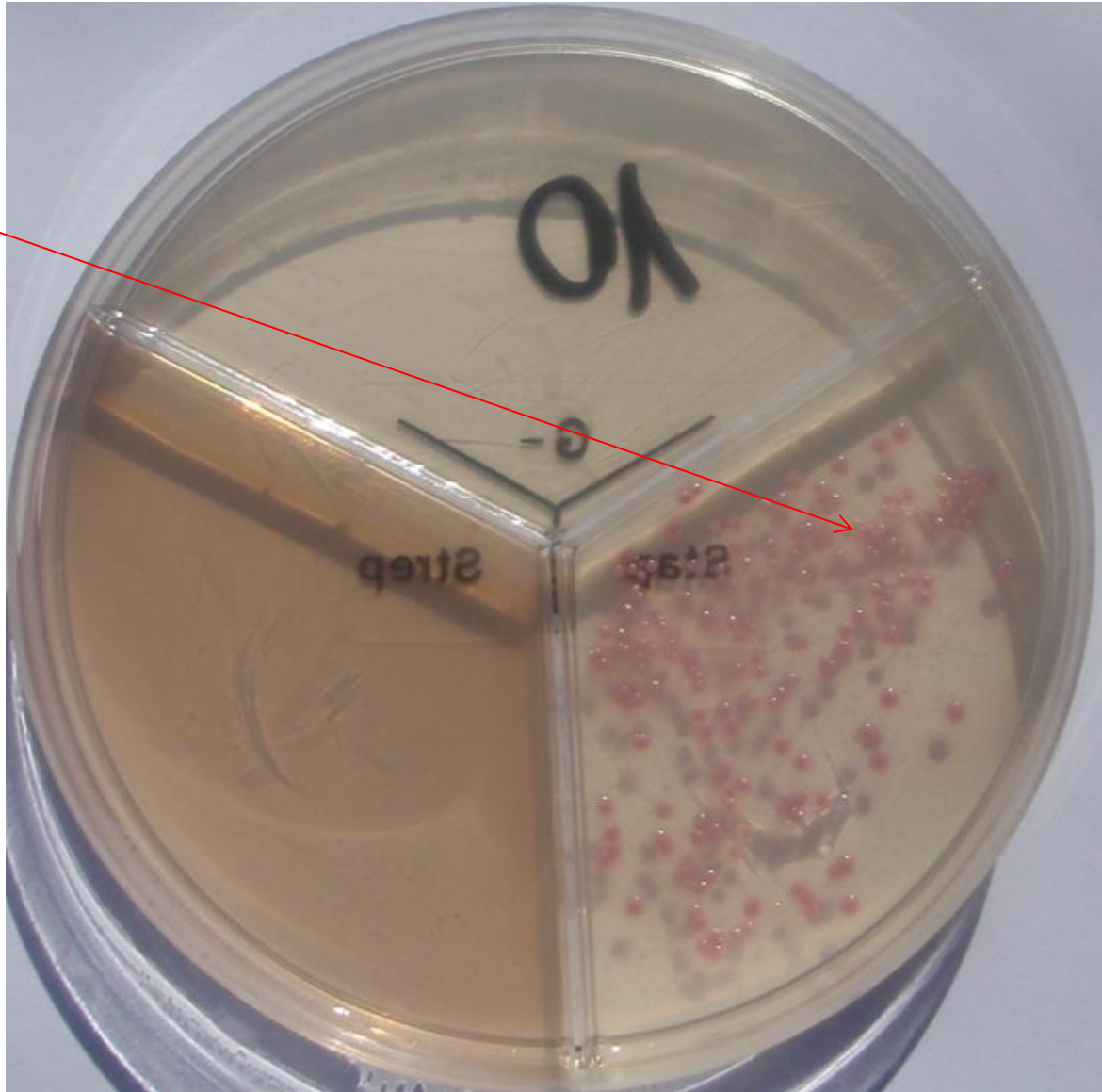
Staphylococcus epidermidis

Pseudomonas aeruginosa



Staphylococcus aureus

- Na PM testu roste v růžových koloniích na STA sektoru
- Subklinické, recidivující (po 6 týdnech) mastitidy
- Dokáže přežít uvnitř bílých krvinek, kde je neléčitelný ATB
- Léčí se při zaprahování
- Pro ozdravení stáda nutný systém opatření



STEP 3.

Sestavení systému kontroly mastitid
Vypracování protokolů léčby

Farma B

SCC přes
800 tisíc

IMM
Chymotripsinum
2x po 24hod

Patrně
proběhla
G- mastitida

SCC přes
400 tisíc

Mast
6x po 12hod

KONTROLA
UŽITKOVOST

Bez nálezu
patogenů

Nejsou klinické změny

IMM Prednisolonum
2-5x po 24hod + mast

KRITERIA
1.KU nad 300 tis.
90 dnů p.p.
SB o 100%

E. coli

Lokální klinika (čtvrť)

Drenč 50l, (INJ ATB)
INJ NSAID 2-5x po 24hod

Celková klinika (horečka)

Serracia m.

IMM Cefoperazone
3x po 24hod + mast

Pseudomonas
aeruginosa

Identifikace
inf. čtvrti

Zasušení čtvrti

Evidence

S. chromogenes
S.epidermidis
S.xylosus

Směs KNS

Patrně
poškozený
kanálek

IMM Amoxicillinum
3x po 24hod + mast

KLINICKÁ
MASTITIDA

Staphylococcus
aureus

Monokultura

IMM Cefquinomum 3x po 12hod
INJ Cefquinomum 4x po 24hod

Monokultura

V laktaci
do 90 dnů p.p.

Po dobu 12 měsíců
všechny krávy
před zasušením

Ojedinělý
nález

Při
zaprahování

IMM DC Cefalonium
Ochranná lhůta nad 50 dnů



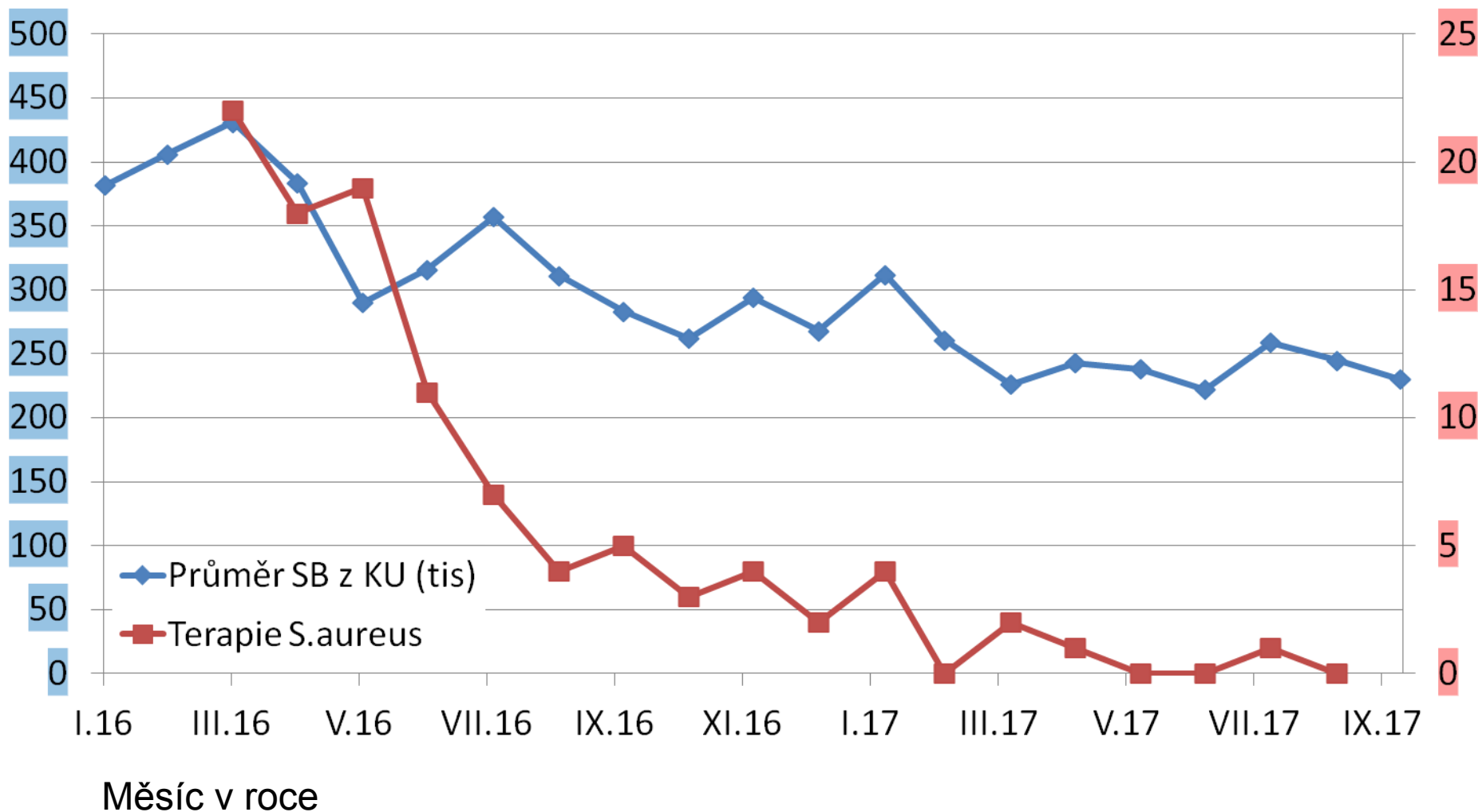
Farma B, mastitidy 2016

	01 2016	02 2016	03 2016	04 2016	05 2016	06 2016	07 2016	08 2016	09 2016	10 2016	11 2016	12 2016
Brakované krávy (ks)	3	15	2	31	7	3	14	15	3	16	12	13
Průměr SB z KU (tisíce)	426	382	406	431	384	290	316	357	311	283	262	294
Počet PM testů (ks)	-	-	-	135	102	88	84	89	79	87	82	84
ATB terapie S.aureus(ks)	-	-	-	22	18	19	11	7	4	5	3	4
Terapie KNS (ks)	-	-	-	3	2	4	1	4	2	3	2	4
Terapie E.coli Klebs. , ostatní	29	32	35	1	0	1	1	2	1	2	0	1
Spotřeba ATB ter. mastitid (Kč)	10920	12636	12870	49920	35568	38402	22750	17264	9620	10946	6318	12116

Farma B, mastitidy 2017

	01 2017	02 2017	03 2017	04 2017	05 2017	06 2017	07 2017	08 2017	09 2017	10 2017	11 2017	12 2017
Brakované krávy (ks)	7	16	3	6	18	5	20	18	4	16		
Průměr SB z KU (tisíce)	268	312	261	226	243	238	222	259	245	230		
Počet PM testů (ks)	73	76	62	26	25	22	28	27	22	23		
ATB terapie+ZP S.aureus(ks)	2	4	0	2	1	0	0	1	0	0		
Terapie KNS (ks)	5	5	3	2	3	4	4	2	5	3		
Terapie E.coli Klebs. , ostatní	1	4	1	2	0	1	4	5	2	1		
Spotřeba ATB ter. mastitid (Kč)	5824	9260	2236	6318	2574	2028	5408	7930	2912	2158		

Farma B, *Staphylococcus aureus*



Sestavení protokolů léčby

Farma C, 90krav

Molekulárně biologické vyšetření. Detekce DNA bakteriálních původců mastitid

Metoda: multiplex real-time PCR

Číslo vzorku: xxxxxxxxx

<u>Původce</u>	<u>Výsledek</u>
Staphylococcus aureus	negativní
Enterococcus sp.	negativní
Corynebacterium bovis	negativní
Gen pro s-laktamazu	negativní
Escherichia coli	pozitivní
Streptococcus dysgalactiae	pozitivní
Staphylococcus sp.	pozitivní
Streptococcus agalactiae	negativní
Streptococcus uberis	pozitivní
Klebsiella sp.	pozitivní
Serratia marcescens	pozitivní
Arcanobacterium pyogenes	negativní

STEP 1.
Vyšetření bazénového vzorku mléka
pomocí metody PCR (SVÚ Jihlava)

Prekultivace

Cíl vyšetření / metoda	vyšetřeno vzorků	negativní	pozitivní	dubiozni
Mycoplasma bovis	1	1	0	0
PCR (Mbov) Molekulárně biologickým vyšetřením Real-Time PCR nebyla zjištěna přítomnost DNA Mycoplasma bovis.				

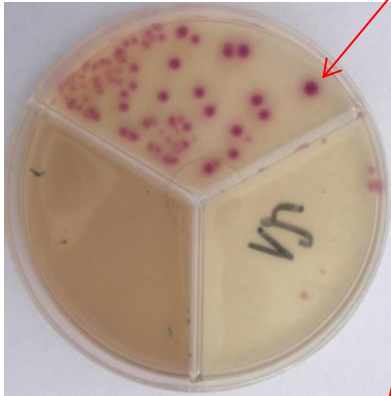
Farma C

STEP 2.

Proškolení práce se sety faremní diagnostiky
Primární depistáž na farmě
Ověření nálezů - Maltitof (laboratoř)

PCR POZITIVNÍ:

Escherichia coli
Streptococcus dysgalactiae
Staphylococcus sp.
Streptococcus uberis
Klebsiella sp.
Serratia marcescens



Staphylococcus xylosus



St

Proč je standartní léčba *Streptococcus uberis* neúspěšná ?

A. – je to nakažlivý patogen, rychle se rozšiřuje a znovu napadá čtvrt'



B. – vytváří ložiska, v kterých ho zničí jen dlouhodobé působení dobře penetrujícího ATB

C. – ATB na něho neučinkují

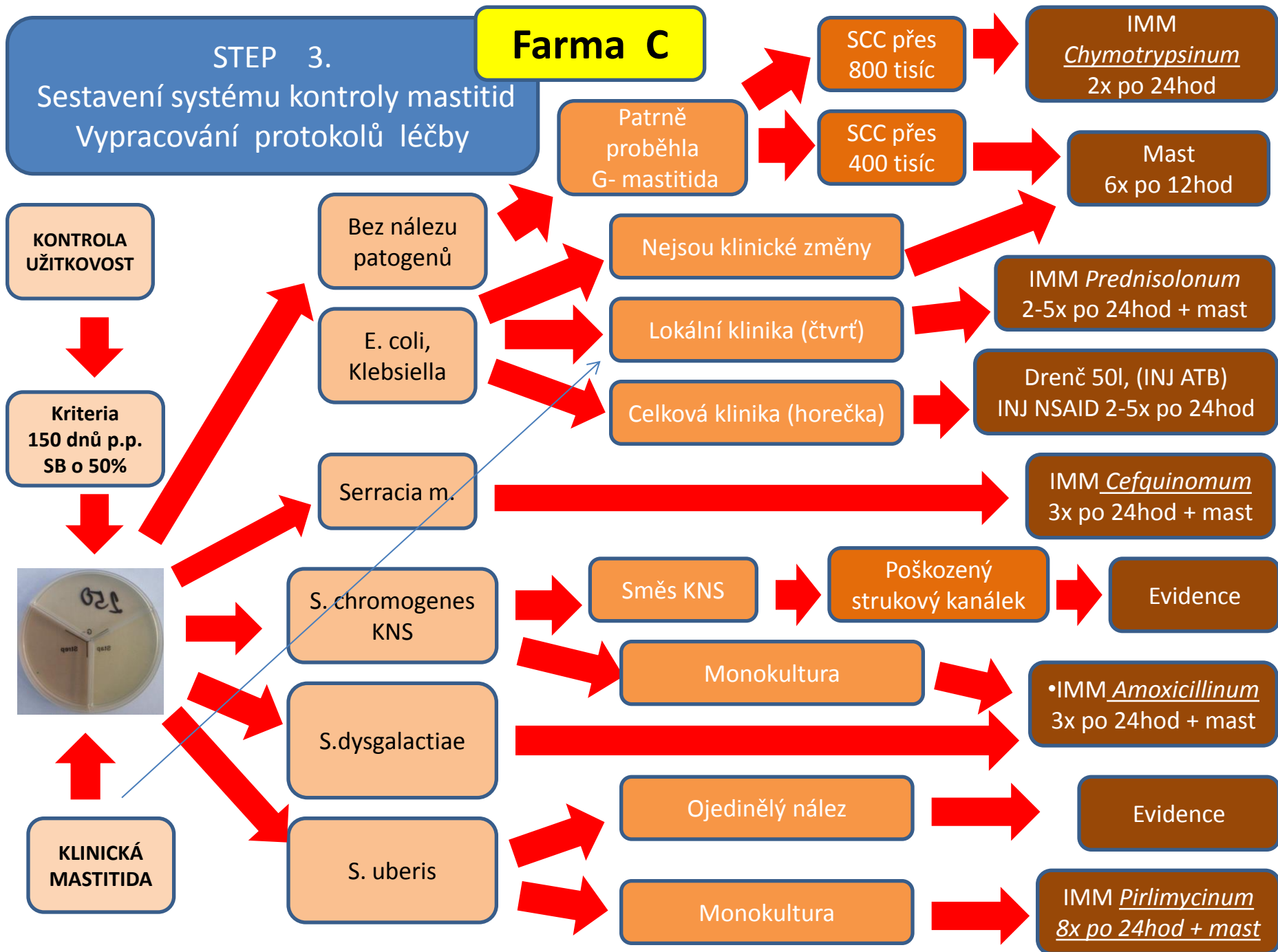
D. – je odolný environmentální patogen a nedá se zničit

pr

STEP 3.

Sestavení systému kontroly mastitid
Vypracování protokolů léčby

Farma C



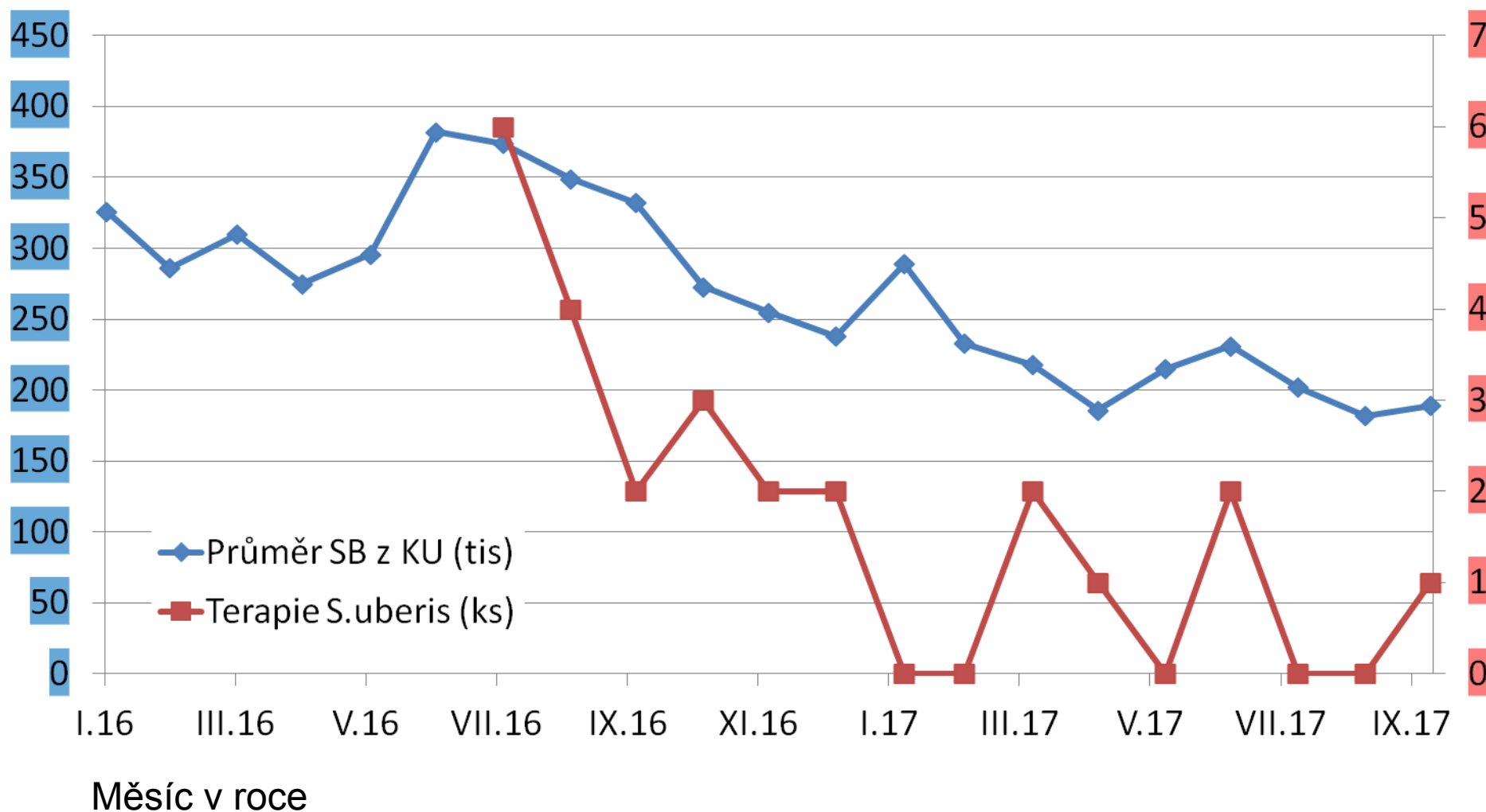
Farma C, mastididy 2016

	01 2016	02 2016	03 2016	04 2016	05 2016	06 2016	07 2016	08 2016	09 2016	10 2016	11 2016	12 2016
Brakované krávy (ks)	1	2	0	6	1	0	3	1	0	7	0	2
Průměr SB z KU (tisíce)	314	326	286	310	275	296	382	374	349	332	273	255
Počet PM testů (ks)	-	-	-	-	-	-	-	32	11	6	5	5
ATB terapie S.uberis(ks)	?	?	?	?	?	?	?	6	4	2	3	2
ATB terapie S.dysgalactiae	?	?	?	?	?	?	?	5	2	1	0	1
ATB terapie KNS (ks)	?	?	?	?	?	?	?	3	0	1	2	2
ATB terapie E.coli Klebs. , ostatní	5	3	5	4	5	11	13	8	2	0	0	1
Spotřeba ATB ter. mastitid (Kč)	1456	832	1248	1118	1612	3796	3926	8086	4628	1872	2574	1976

Farma C, mastitidy 2017

	01 2017	02 2017	03 2017	04 2017	05 2017	06 2017	07 2017	08 2017	09 2017	10 2017	11 2017	12 2017
Brakované krávy (ks)	2	0	0	6	1	0	3	2	1	2		
Průměr SB z KU (tisíce)	238	289	233	218	186	215	231	202	182	189		
Počet PM testů (ks)	6	5	5	7	5	5	8	7	4	6		
ATB terapie S.uberis(ks)	2	0	0	2	1	0	2	0	0	1		
ATB terapie S.dysgalactiae	1	0	0	2	0	2	1	1	0	1		
ATB terapie KNS (ks)	0	1	0	1	1	0	2	3	1	1		
ATB terapie E.coli Klebs. , ostatní	0	1	1	0	1	1	2	2	1	0		
Spotřeba ATB ter. mastitid (Kč)	1690	728	572	1820	962	650	2158	1092	416	988		

Farma C, *Streptococcus uberis*



Sestavení protokolů léčby, časový harmonogram rady z praxe

- Při zavádění systému kontroly mastitid z první kontroly užitečnosti prověříme PM testem krávy nad 1 milion SCC
- Z nich bez nálezu bakterií bude cca 60% (většinou s ireverzibilně poškozeným parenchymem mléčné žlázy) – bez rizika nakažení pro zdravé dojnice
- Zbývajících cca 40% bude pozitivních na nárůst patogenů
- U krav se zachytem mikroorganismů neléčitelných ATB - M. bovis, Pseudomonas, Prothoteka, Nocardia identifikujeme postiženou čtvrt' (čtvrt'ové hodnoty SB) a provedeme nucené zasušení
- U krav s dlouhodobým působením S.aureus, S.uberis, S.parauberis je pravděpodobné selhání jakékoli léčby – zvážíme vyřazení (kritéria hodnocení – kolik měsíců jsou zvýšené SCC, počet postižených čtvrtí, fáze laktace)
- Odhad doby intenzivního systému kontroly mastitid do cíleného zlepšení parametrů (cca 3 měsíce u S.agalactiae, 9 měsíců u S.aureus, 2 roky u S.uberis a S.parauberis)
- **Management farmy musí mít vůli a prostředky k udržení nastaveného systému**

Závěrem...

- Odlišnost mastitid je daná nejen klinickým rozlišením, ale musíme zohlednit i přítomnost a druh etiologického agens
- Každý patogen mléčné žlázy má svoji strategii, jak čtvrt' infikovat, jak se bránit obranným reakcím imunitního systému dojnice, jak přežít útok terapeutik a jak se dál šířit.
- Z odborného a ekonomického hlediska není správné v chovu mléčného skotu hledat univerzální antibiotikum na všechny mastitidy, preferujeme zavedení více protokolů léčby, používání jednodruhových ATB, antibiotika s indikačním omezením aplikujeme jen v odůvodněných případech
- PM test barevně odliší více než 30 druhů patogenů mléčné žlázy. Druhovú diagnostiku původce mastitidy nám umožňuje minimalizovat náklady na léčbu při vlastní ceně PM testu 85 Kč

Děkuji za pozornost ...

