



ZÁNĚTY MLÉČNÉ ŽLÁZY - MASTITIDY

ODBĚR VZORKŮ, ULOŽENÍ, TRANSPORT, VYŠETŘENÍ



Vzorky k vyšetření:

- 1. MLÉKO / SEKRET MLÉČNÉ ŽLÁZY**
- 2. MLÉČNÉ FILTRY**
- 3. BAKTERIÁLNÍ KULTURY NA KULTIVAČNÍCH MEDIÍCH**

1) MLÉKO / SEKRET MLÉČNÉ ŽLÁZY

POSTUP ODBĚRU VZORKŮ MLÉKA

Obecně:

- **ODBĚR VZORKŮ VŽDY DO STERILNÍCH VZORKOVNIC!**
- **NUTNÉ DODRŽET HYGIENU ODBĚRU A ZABRÁNIT KONTAMINACI VZORKŮ!**
- **ODBĚR VZORKŮ PRO BAKTERIOLOGIECKÉ, MYKOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ A VYŠETŘENÍ METODOU PCR SE PROVÁDÍ SHODNĚ**

Postup odběru:

1. odběr vzorků provádíme vždy **ve sterilních jednorázových rukavicích**
2. **mechanická očista** vemene, jednotlivých struků
3. **osušení** – nejlépe jednorázovou papírovou osuškou, utěrkou
4. **desinfekce konce struků a ústí strukového kanálku** – komerční přípravky
5. **oddojení prvních 3 stříků mléka** do pomocné nádoby (vyloučí se tím kontaminace vzorku ze strukového kanálku); takto oddojené mléko se nemá vylít ve stáji, musí se likvidovat mimo stáj, stání, dojírnu apod.
6. **označení zkumavky** – jednoduše - pořadovým číslem (pořadové číslo se uvede také v objednávce vyšetření, kde se souběžně uvede registrační číslo krávy); označení zkumavky musí být čitelné a odolné (např. permanentní fix)
7. **otevření zkumavky** - tak, aby se zkumavka ani zátka nekontaminovaly rukama ani zevním prostředím (vnitřní plochy zátky se nedotýkáme, držíme ji opatrně vnitřní plochou směrem k podlaze)
8. **oddojení vzorku - 5 – 10 ml sekretu/mléka** z mléčné žlázy
9. zkumavku řádně uzavřít a uložit v pořadí do stojanu k ostatním vzorkům

Vzorek čtvrtový, půlový, směsný, bazénový?

- **čtvrtový, půlový** – při postižení/zánětu jedné čtvrtě nebo ½ mléčné žlázy
- **směsný ze všech čtvrtí** – vhodný pro preventivní vyšetření, při vyšším počtu somatických buněk, při subklinických zánětech
- **bazénový vzorek** – pro screeningové vyšetření stáda (není obvyklý)

POSTUP ODBĚRU BAZÉNOVÉHO VZORKU

1. **popis vzorkovnice**
2. **otevření vzorkovnice = GLS láhev 0,5 - 1 l** tak, aby nedošlo ke kontaminaci hrdla lahve a ani zátky. (vnitřní plochy zátky se nedotýkáme, držíme ji opatrně vnitřní plochou směrem k podlaze)
3. na odběr z tanku se použije **sterilní naběračka**, popř. napuštění mléka ventilem tanku
4. naběračkou se nabere **promíchané mléko z tanku a opatrně se vlévá do sterilní lahve** tak, aby mléko nestékalo po rukách do vzorkovnice. Opakujeme, aby byl objem vzorku 250 – 500 ml.
5. **hrdlo lahve/vzorkovnice neotíráme** a uzavřeme zátkou.

DO ČEHO?

- **vždy sterilní vzorkovnice / zkumavky** (např. 10 ml zkumavky nebo sterilní GLS lahve)
- **laboratoř dodává jednorázové sterilní zkumavky** po telefonické objednávce (popř. také stojánky k zapůjčení při větším počtu vzorků)
- nedoporučujeme: PET láhve apod.
- nutné dodržet hygienu odběru a zabránit kontaminaci vzorku!
- **pozn. nedoporučujeme tampon** nasáknutý mlékem (sekretem z mléčné žlázy) vložený do Amies media **či stěry z povrchu** struku v Amies mediu

KOLIK (OBJEM)?

- **pro standartní bakteriologické vyšetření: 5 – 10 ml / 1 vzorek**
- **pro vyšetření bazénového vzorku: 250 – 500 ml**
- **pro metodu PCR: vždy 250 – 500 ml**

JAKÝ POČET VZORKŮ?

Počet vzorků k laboratorní diagnostice by měl vždy zohlednit:

- počet dojených krav ve stádě
- počet postižených „mastitidních“ krav

Počet vzorků podle důvodu vyšetření:

- **klinické mastitidy** (podle četnosti a průběhu onemocnění) – **většinou 5 - 10 vzorků**
- **těžko léčitelné mastitidy, selhání terapie** – **jednotlivé vzorky**
- **vysoký počet somatických buněk** – vybrané vzorky – optimálně **5 – 10 vzorků**
- **prevence** – odběr podle skupin zvířat - **po 5 – 10 vzorcích**
- **screening** - např. cíleně zaměřený na průkaz *Staphylococcus aureus* – vhodné odebrat všechny laktující krávy
- **kontrola před zaprahnutím** – podle počtu zaprahovaných dojnic
- **na průkaz *Mycoplasma bovis*** – jednotlivé vzorky (podle počtu laktujících krav, popř. bazénový vz.)
- **popř. možnost vytvoření skupin:** např. skupina s vyšším počtem somatických buněk, skupina s akutními nebo i chronickými záněty, skupina před zaprahnutím, skupina těžko léčitelných zánětů apod.

ZÁSADA: nevyšetřovat léčené kusy; u přeléčených pak pro následný kontrolní odběr dodržet ochrannou lhůtu a časový odstup.

JAKÉ PATOGENY JE MOŽNO IZOLOVAT/DETEKOVAT?

- **kontagiozní patogeny - zdrojem je mléčná žláza:**
Staphylococcus aures, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Mycoplasma bovis*, koaguláza negativní stafylokoky, *Corynebacterium bovis*
- **enviromentální patogeny – zdrojem je vnější prostředí:**

enviromentální streptokoky (*Streptococcus uberis*, *Streptococcus equinus (bovis)*, *Streptococcus dysgalactiae*), *Enterococcus spp.* (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* aj.), koliformní bakterie (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella aerogenes*, *Enterobacter aerogenes*), koliformní bakterie (*Proteus sp.*, *Serratia spp.*, *Yersinia sp.*), jiné (*Pseudomonas aeruginosa*, *Trueperella pyogenes (Arcanobacter pyogenes)* aj.) atd.

➤ **kvasinky, plísně, řasy**

Důležité:

- sterilní odběr se podílí na správném a kvalitním laboratorním výsledku bakteriologického vyšetření
- vždy je nutno při interpretaci výsledků zohlednit i možnost kontaminace
- při masivním výskytu podmíněných patogenů je nutno i tyto považovat za původce mastitid

PRO JAKÁ LABORATORNÍ VYŠETŘENÍ?

Základní diagnostické postupy:

1. standartní klasické bakteriologické a mykologické vyšetření vč. stanovení terapie lokální (intramamární) nebo celkové

- využití **standardních postupů (prekultivace, kultivace, izolace a identifikace** metodami biochemickými, latexovými, CAMP testy apod.) či moderních postupů fenotypové identifikace mikroorganismů – bakterií a kvasinek (**MALDI-TOF**)
- rutinně se provádí **testace citlivosti bakterií k antimikrobiálním látkám** s využitím **metody MIC** (mikrodiluční metoda stanovení minimální inhibiční koncentrace a citlivosti) nebo **disková difusní metoda**. Testuje se kompletní sestava schválených antimikrobik v ČR nebo dle požadavku zákazníka jen na vybraná antimikrobika.

2. molekulárně biologické metody – možnost využití individuálních i bazénových vzorků

- využití **individuálních PCR testů** či **screeningových PCR testů** jako např. metoda **Multiplex Real-Time PCR (PathoProof Mastitis PCR Assay)** – touto metodou se v rychlé době stanovuje minimálně DNA 11 bakteriálních patogenů a gen způsobující rezistenci na beta-laktamová antibiotika. Výsledek je vyjádřen semikvantitativně.
- **výhoda** – kratší doba vyšetření, vyšší citlivost a specifita
- **nevýhoda** – **nelze provést antibiogramy**, tj. testaci citlivosti k antimikrobikům, resp. v případě zájmu o antibiogramy musí zároveň probíhat i klasická izolace/kultivace
- **výčet DNA targetů metody Multiplex Real-Time PCR (PathoProof Mastitis PCR Assay):** *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Corynebacterium bovis*, *gen pro beta-laktamázu*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus sp.* včetně koaguláza negativních stafylokoků, *Klebsiella oxytoca a pneumoniae*, *E. coli*, *Serratia marcescens*, *Trueperella pyogenes*, *Peptoniphilus indolicus*.

Cílená vyšetření - vyšetření lze **po dohodě s laboratoří** a po specifikaci požadavku v objednávce zaměřit cíleně na **např. na:**

- všechny běžné patogeny mléčné žlázy
- na průkaz *Staphylococcus aureus* či na *Streptococcus agalactiae* apod.
- pouze na kvasinky a plísně

- speciálně na *Mycoplasma bovis* (např. individuální vyšetření PCR na *Mycoplasma bovis* – po prekulivaci vzorku mléka)
- speciálně na *Prothotheca sp. (řasy)*
- s cílem provedení testace citlivosti izolovaných patogenů k antibiotikům
- nebo dle metod např. pouze na PCR apod.

UCHOVÁNÍ A TRANSPORT VZORKŮ?

- vzorky **čerstvého mléka** uchovat v **lednici (2-8°C)** a co nejdříve dodat do laboratoře (**nejpozději do 24 hodin**)
- **zamrazování vzorků:**
 - předpokládá použití plastových zkumavek
 - lze doporučit pro vyšetření **PCR** metodami
 - pro klasickou bakteriologii pouze v případě, že není možné vzorky doručit do laboratoře do 24 hodin po odběru
 - může dojít k ovlivnění výsledků vyšetření - vhodné konzultovat s laboratoří (výhodou může být archivace vzorků)
- pokud budou vzorky odebírány **cíleně na průkaz *Mycoplasma bovis*** kultivačním vyšetřením, pak je nutno se kontaktovat s laboratoří a dodat je okamžitě a čerstvé nebo je zamrazit (-20°C) pro uchování do 2 týdnů, pro delší skladování -80°C, jinak *M. bovis* pro kultivaci degraduje.

Doporučení:

Pokud se jedná o **plánované vyšetřování vzorků** pro bakteriologické, mykologické a PCR vyšetření, preferujeme odběr čerstvých vzorků mléka a to vzhledem k postupu a charakteru vyšetření. Dále laboratoř preferuje dodání vzorků počátkem pracovního týdne.

Pokud se jedná o **odběry z akutních nebo jinak naléhavých případů** před víkendem a o svátcích, **kontaktujte laboratoř** (zvláště při větším počtu vzorků), neboť je nutná příprava kultivačních medií (víkendy, svátky).

2) MLÉČNÉ FILTRY

- mléčné filtry se využívají pouze pro orientační diagnostiku
- před mléčnými filtry upřednostňujeme vzorky mléka (jednotlivé či bazénové)
- nutný sterilní odběr do sterilního obalu (sáčku)
- ostatní (transport, možnosti diagnostiky apod.) viz výše kapitola „MLÉKO“.

3) BAKTERIÁLNÍ KULTURY NA KULTIVAČNÍCH MEDIÍCH

- vyšetřují se bakteriální kultury z kultivačních medií ze stájových testů
- k vyšetření se dodávají **kultivační misky s označenými bakteriálními koloniemi** k identifikaci
- misky zajistit savým a nepropustným obalem
- dodat nejlépe po dohodě s laboratoří
- označené kolonie se v laboratoři identifikují metodou MALDI-TOF, či klasickými bakteriologickými metodami a testy

- identifikace bakterií z kultur stájových testů je možné provést v den dodání vzorků a ihned se vyřizují výsledky
- někdy nutno provést izolaci kultury a pak teprve identifikaci metodou MALDI –TOF
- v případě požadavku provádíme včetně testace citlivosti k antimikrobikům
- ostatní (transport, možnosti diagnostiky apod.) viz výše kapitola „MLÉKO“

ONEMOCNĚNÍ MLÉČNÉ ŽLÁZY – vyšetření v laboratořích SVÚ JIHLAVA		
patogeny mléčné žlázy	vhodné vzorky	laboratorní diagnostika
<p>kontagiozní patogeny - zdrojem je mléčná žláza: <i>Staphylococcus aures, Streptococcus agalactiae, Streptococcus dysgalactiae, Mycoplasma bovis, koaguláza negativní stafylokoky, Corynebacterium bovis</i></p>	<p>A) mléko - vzorek idividuální (čtvrtový, půlový, směsný) - bazénový vzorek mléka</p> <p>B) mléčné filtry</p> <p>C) bakteriální kultury na kultivačních mediích</p>	<p>1. bakteriologické a mykologické vyšetření vč. stanovení terapie</p> <ul style="list-style-type: none"> • prekultivace, kultivace, izolace a identifikace • MALDI-TOF • testace citlivosti k antimikrobiálním látkám (MIC, disková difusní metoda) <p>2. molekulárně biologické metody</p> <ul style="list-style-type: none"> • individuální PCR testy • screeningové PCR testy (multiplex Real-Time PCR) – minimálně 11 bakteriálních patogenů + gen způsobující rezistenci na beta-laktamová antibiotika
<p>enviromentální patogeny – zdrojem je vnější prostředí: enviromentální streptokoky (<i>Streptococcus uberis, Streptococcus equinus (bovis), Streptococcus dysgalactiae</i>), Enterococcus spp. (<i>Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Enterococcus durans aj.</i>), koliformní bakterie (<i>Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Klebsiella aerogenes, Enterobacter aerogenes, Proteus sp., Serratia spp., Yersinia sp.</i>), jiné (<i>Pseudomonas aeruginosa, Trueperella pyogenes (Arcanobacter pyogenes) aj. atd.</i></p>		
<p>kvasinky, plísně, řasy</p>		

