

# Diagnostika mastitid skotu z pohledu laboratoře

**Státní veterinární ústav Praha**

**Odd. bakteriologie**

**Tomáš Černý**

# Algoritmus managementu mastitid

1

- Exces ukazatelů hodnocení kvality mléka

2

- Primární identifikace problémů v chovu

3

- Primární opatření

4

- Sekundární analýza příčin problémů

5

- Potvrzení nebo úprava primárních opatření

6

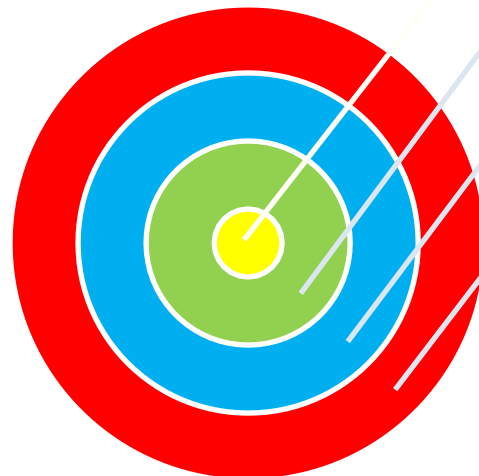
- Úprava managementu mléčné produkce

# Diagnostika a léčba mastitid

- Posouzení celkového zdravotního stavu zvířat
- Klinické příznaky MŽ – mléko/změněný sekret
- Počet SB v mléce (NK-test)
- Primární intervence (zootecnická/veterinární)
- Stanovení původců mastitid
- Stanovení C/I/R původců k ATB
- Výběr ATB dle výsledů testování
- Stanovení schématu léčby reflektující reprodukční periodu jednotlivce a stáda
- Cyklická kontrola/úprava zavedené strategie

# Stanovení původců mastitid

- Kultivace v mikrobiologické laboratoři
- Molekulárně genetická diagnostika
- Stájová diagnostika (kultivace, microwells)



Úskalí

Validita

Cena

Rychlost



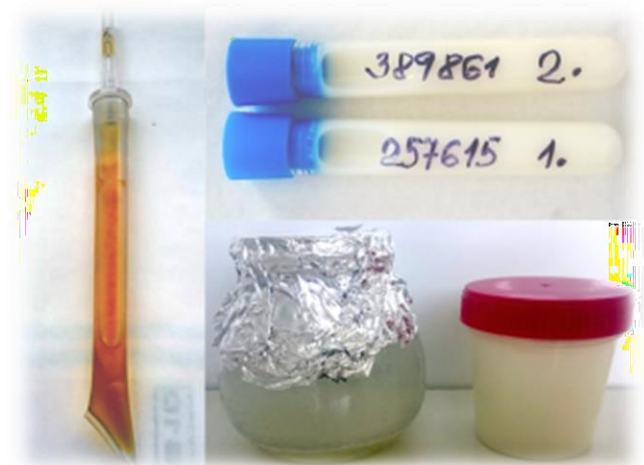
# Adekvátní technika odběru vzorků

## Individuální vzorky - původci mastitid:

- Suchá toaleta vemene
- Dezinfekce hrotu struku (70% etanol, jednorázová utěrky)
- První odstříknutí do hrnečku
- Nadojení 5-10 ml do sterilní zkumavky (jedním stříkem)
- Opatrná manipulace se vzorkovnicí během odběru !!!
- Označení vzorkovnice

## Bazénové vzorky - původci mastitid:

- Promíchaný tank
- Před úplným zchlazením
- Odběr 5-10 ml do vzorkovnice (naběračka)
- Označení vzorkovnice



**Případnou kultivaci odebraných vzorků je nutno povést vždy mimo místo odběru v relativně čistém prostředí.**

# Kultivace v mikrobiologické laboratoři

- Zlatý standard - nebo už to neplatí?
- Komplexita vyšetření
- Postupy pro low-level detekci *Streptococcus* spp.
- Testování antibiogramu původců (ATB-R)
- Časová a logistická náročnost
- Interpretační problémy
- Možná absence užšího vztahu laboratoře s objednatelem vyšetření

# Molekulárně genetická diagnostika

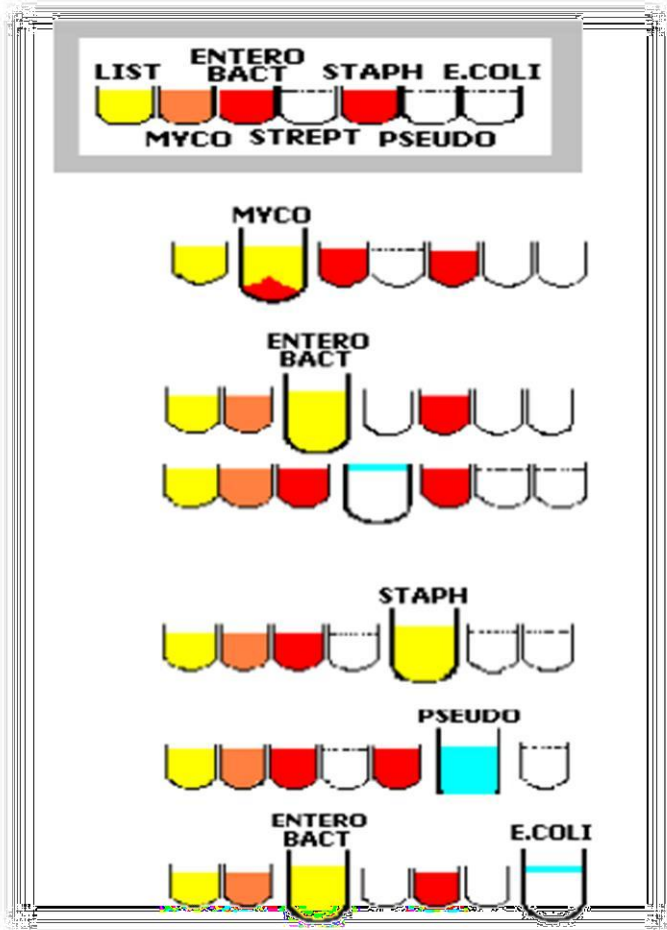
- Komerční kity (PathoProof Mastitis)
- Publikované single/multiplex PCR
- Detekce 1-16 původců - komplexita vyšetření
- Vysoká senzitivita
- Detekce DNA a ne živého původce
- Cena x použitelnost v ČR za reálnou cenu?
- Absence informace o ATB rezistenci (blaZ)
- Interpretační těžkosti
- V některých případech nezastupitelná - Mykoplazmata

# Stájová diagnostika (microwells)

- Komerční souprava pro stájovou diagnostiku
- BVT Speed Mam Color
- Jamková diagnostika sedmi základních původců
- Semikvantitativní stanovení citlivosti ke 14 ATB
- Detekce na základě odečtu barevných jevů
- Rychlost identifikace 24-48 hod (7-10 dní)
- Možná dezinterpretace výsledků typizace !!!
- Možná dezinterpretace výsledků C/I/R !!!
- Vysoký požadavek na precizní provedení testu



# BVT Speed Mam Color - Virbac



## Testovaná ATB:

- Amoxicillin + clavulanic acid
- Ampicillin + colistin
- Cephalexin
- Cefoperazone
- Cefquinome
- Cloxacillin
- Danofloxacin
- Gentamycin
- Marbofloxacin
- Penicillin + streptomycin
- Spiramycin
- Sulphadimidine + trimethoprim
- Tetracycline + neomycin + bacitracin
- Tylosin

## Detekovaní původci:

- Staphylococcus spp.
- Streptococcus spp.
- Escherichia coli
- Enterobacteriaceae
- Listeria spp.
- Mycoplasma spp.
- Pseudomonas spp.

# Stájová diagnostika (chromogenní půdy)

- Soupravy pro stájovou diagnostiku
- Dělená kultivační média 1/3, 1/4
- MicroMast (detekce G-,G+, smíšený růst)
- PM-test (selektivní chromogenní média G-, Sta, Str)
- Intelligence Diagnostic (DCFC, LC, ID 4 BULK test)
- 3M Petrifilm (STX, AE, COLI)
- Zaškolení, knihovna verifikovaných původců
- Rychlost identifikace
- Dezinterpretace výsledků
- Následná typizace kolonií MALDI-TOF
- Absence informace o ATB rezistenci
- Požadavek na adekvátní provedení testu

# Selektivní chromogenní média - principy

## Selektivní principy

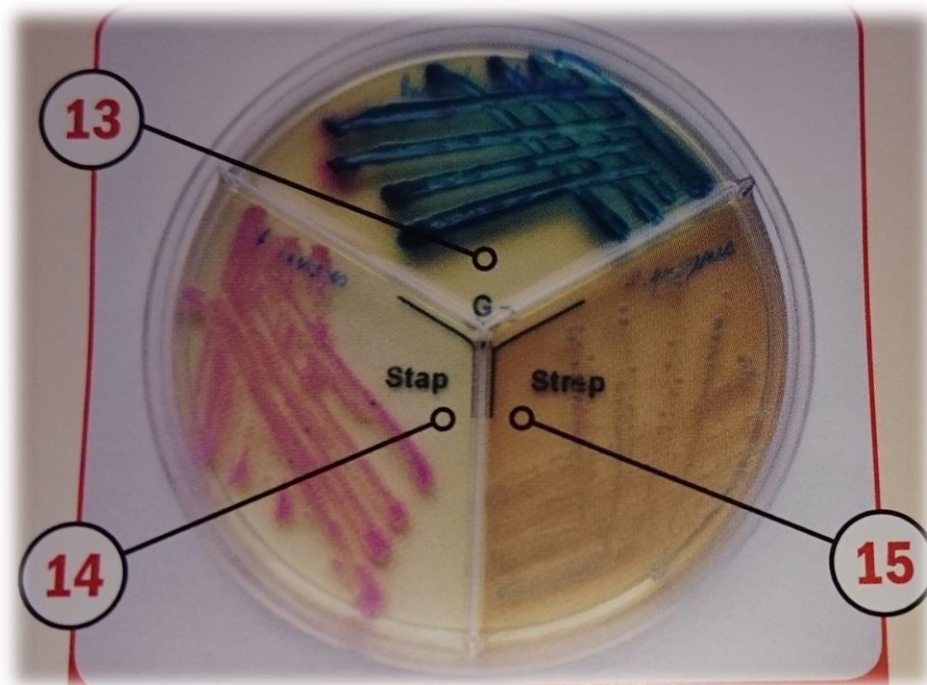
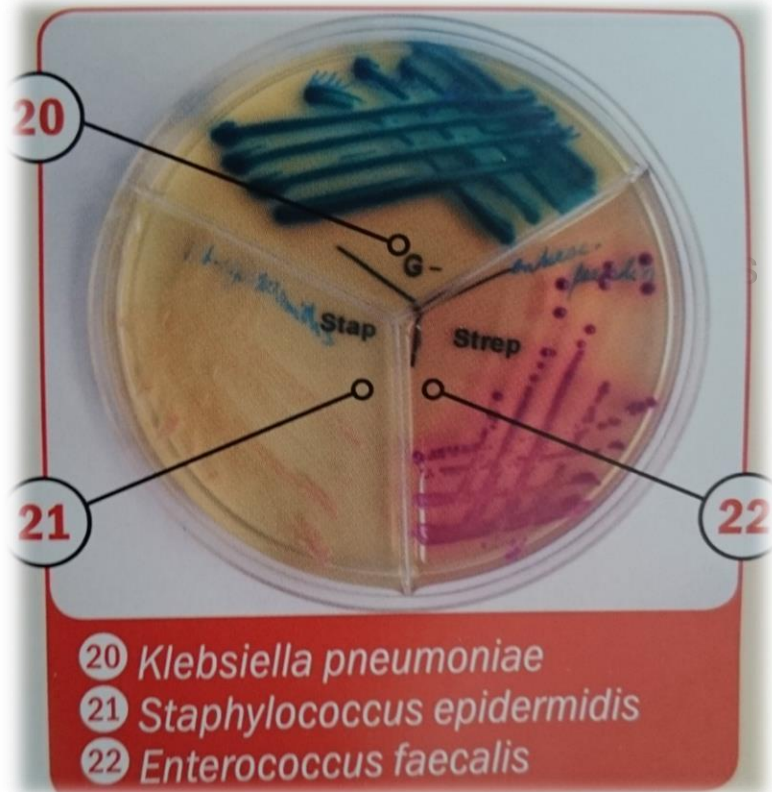
- $\text{NaN}_3$
- $\text{NaCl}$
- Glycin
- $\text{LiCl}$
- Kolistin
- Polymyxin B
- Mupiomcin
- Vankomycin
- Clindamycin

## Chromogenní principy

- $\beta$ -glukosidáza - maltóza
- $\beta$ -galaktosidáza - laktóza
- Tryptofan deamináza –  $\text{NH}_3$
- Eskulin – žlučové kys. +  $\text{Fe}^{+3}$



# Chromogenní půdy – jak na to



# Stájová diagnostika mastitid - jak na to

## Chovatel/veterinář:

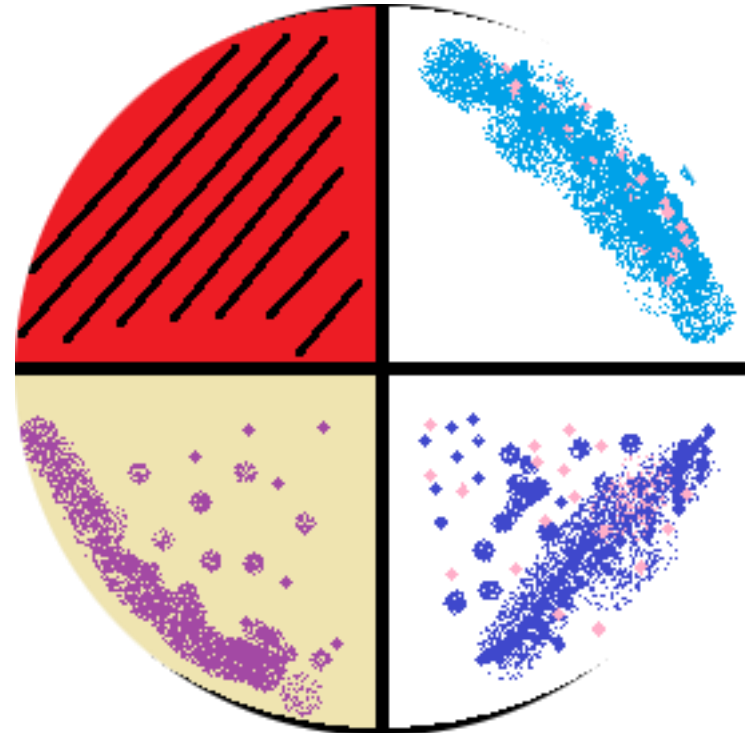
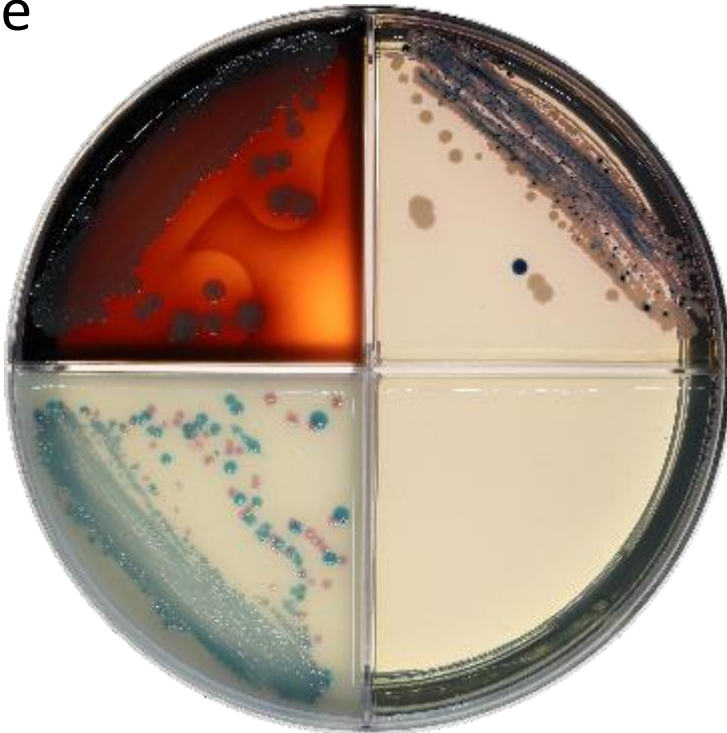
- Odběr vzorků
- Správný postup kultivace
- Pečlivost provedení
- Evidence záznamů
- Dezinterpretace výsledků
- Spolupráce s laboratoří

## Poskytovatel médií:

- Zaškolení personálu
- Knihovna verifikovaných původců
- Rychlost identifikace
- Podpora zákazníka
- Identifikace úskalí metody

# Adekvátní technika kultivace

- Označení ploten tak, aby nedošlo k záměně
- Vzorek mléka naneste v souvislé inokulační linii (čáře) kličkou na povrch média.
- Opakujte v každé sekci média
- Následně proveďte rozočkování inokulačních linií několika kličkami tak, aby na konci inokulačních čar bylo možné vidět jednotlivé kolonie



# Odečítání – jak na to

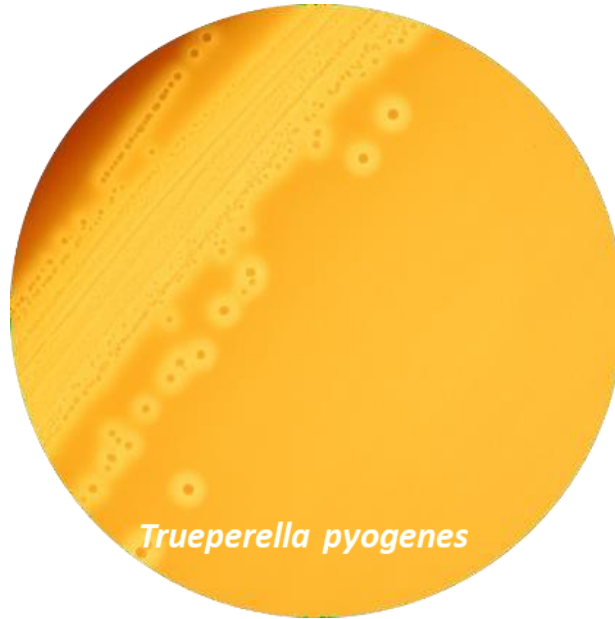
- Doba inkubace (24-48-72 hod) potřebná pro charakteristický růst (vizuál) kolonií
- Odlišení nárůstu od precipitace mléka
- Růst na jednotlivých částech
- Barva kolonií
- Charakter kolonií (průhledné , suché, krémovité, s precipitací od agaru)
- Typ hemolýzy kolonií na médiu s krví
- Hydrolýza eskulinu; tmavý pigment kolonií a jeho difuze do krevního agaru



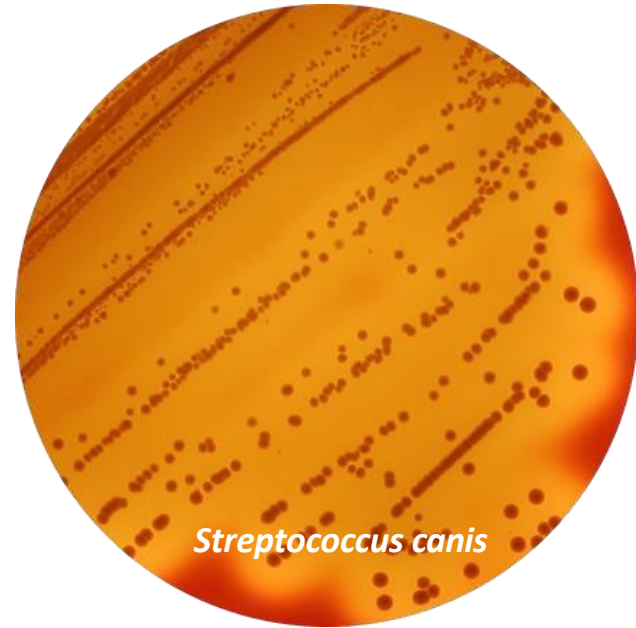
# Hemolýza - co to je ?



*Staphylococcus aureus*



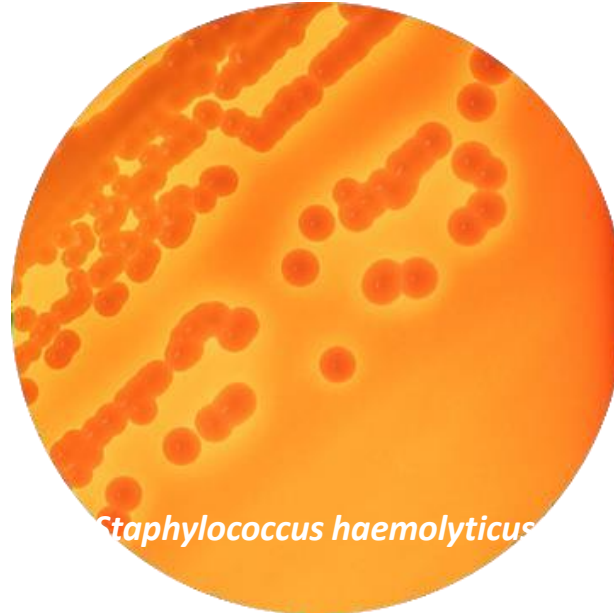
*Trueperella pyogenes*



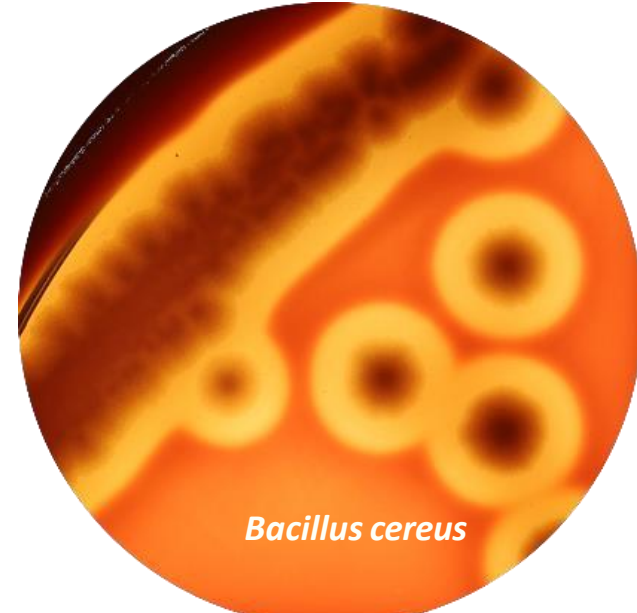
*Streptococcus canis*



*Streptococcus agalactiae*



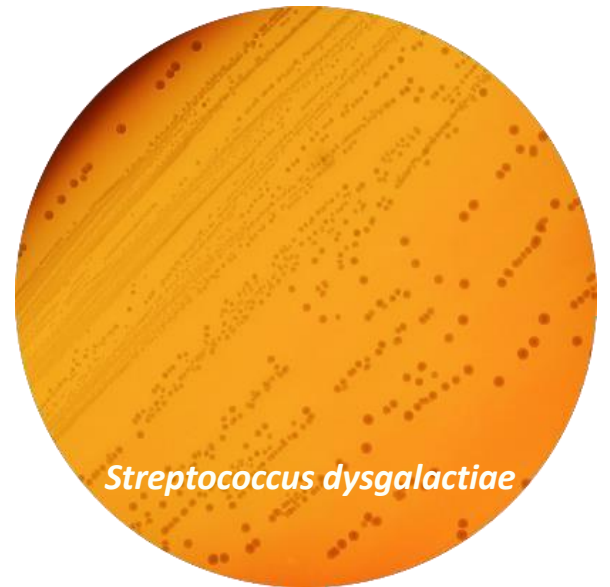
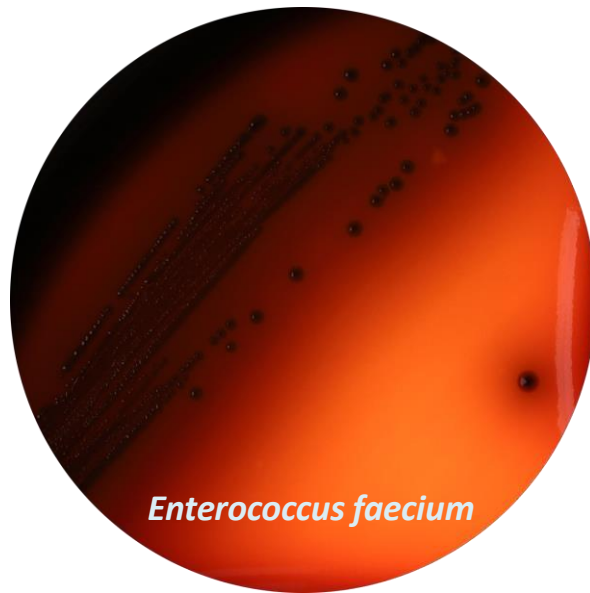
*Staphylococcus haemolyticus*



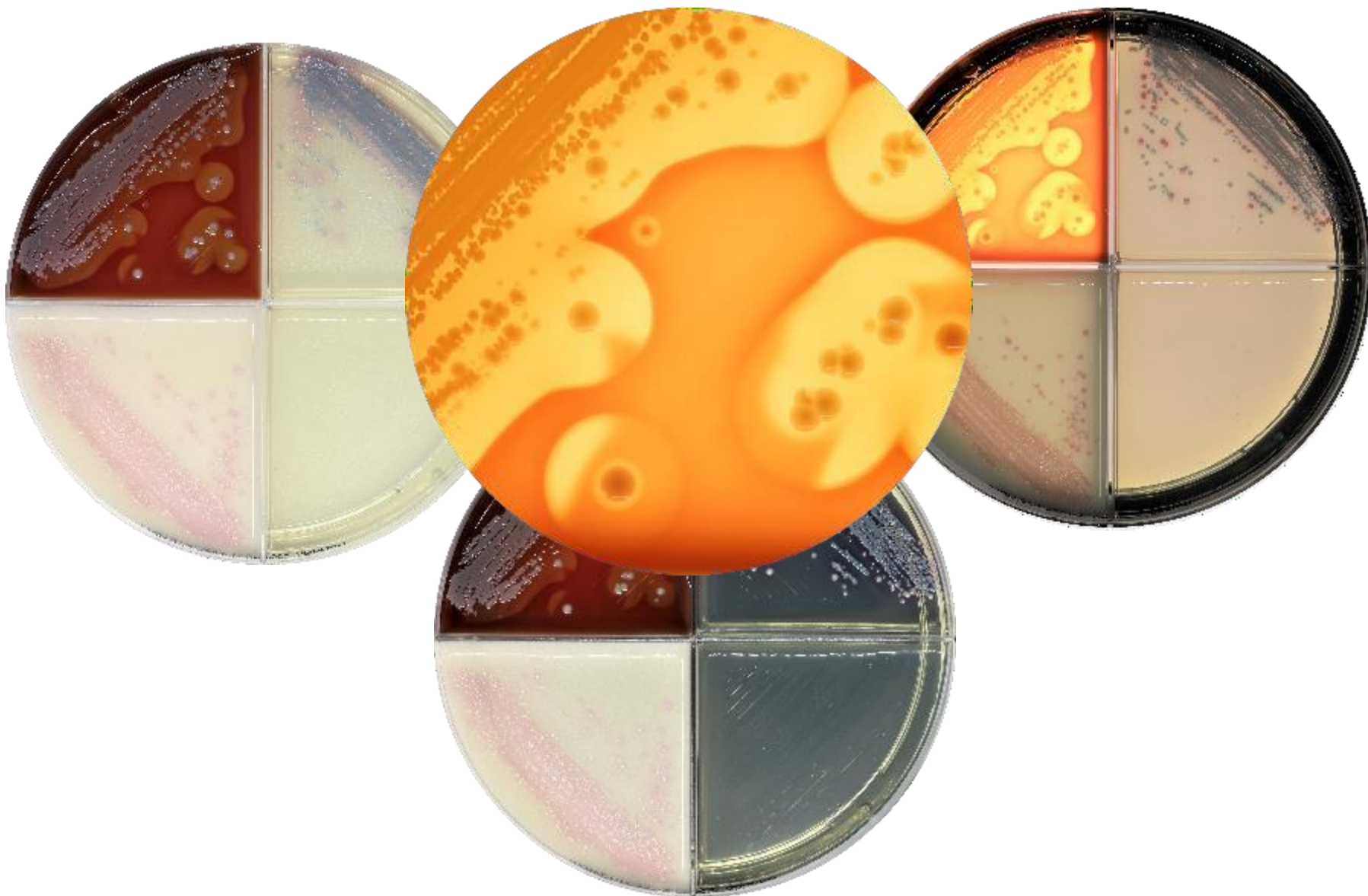
*Bacillus cereus*



# Viridace a hydrolýza eskulinu - co to je?



# Odečítání – Pozorování vizuálních vlastností



# Odečítání – Pozorování vizuálních vlastností





# Doba inkubace- vizuální rozdíly

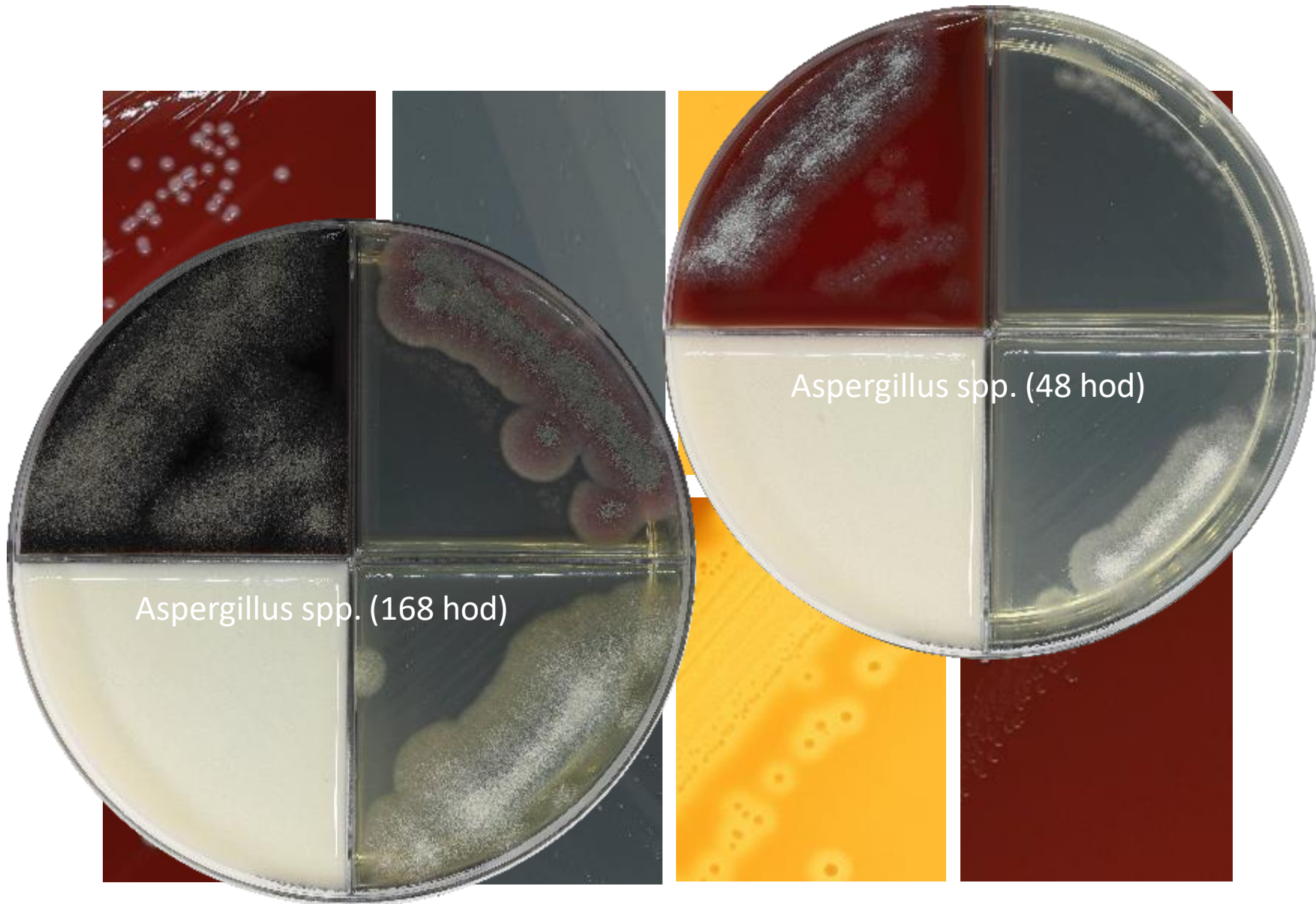
## Po 24 hodinové inkubaci neprokážeme:

- *Trueperella pyogenes*
- *Corynebacterium bovis*
- *Prothoteca zopfii*
- *Psychrobacter* spp.
- *Campylobacter* spp.
- Některé kvasinky a plísně (někdy nutno >72 hod.)

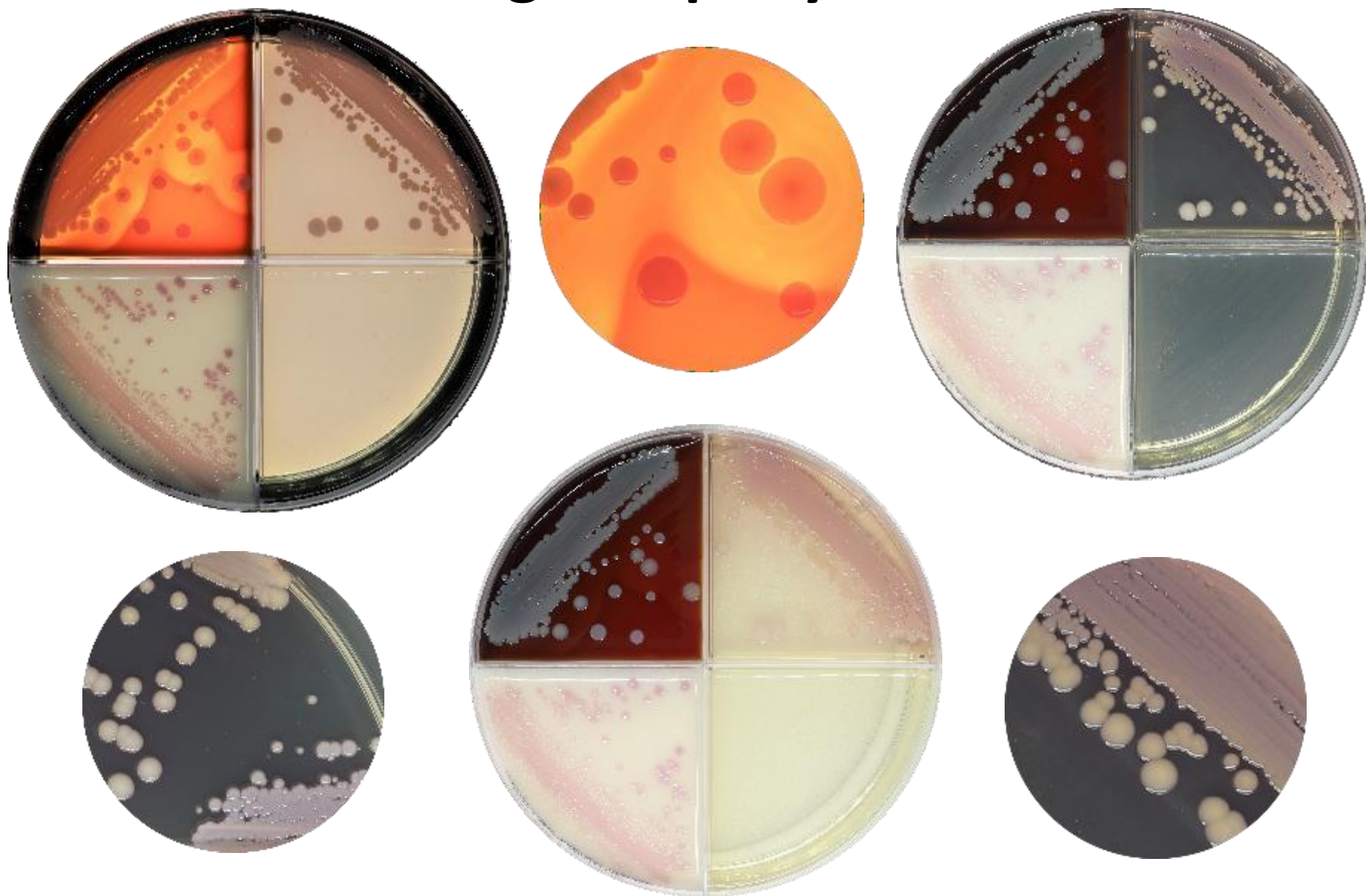


Při prodloužené inkubaci (48 hod) je u řady původců dosaženo vysoce charakteristického růstu (vizuálu) s typickým zbarvením, hemolýzou atd.

# Doba inkubace- vizuální rozdíl

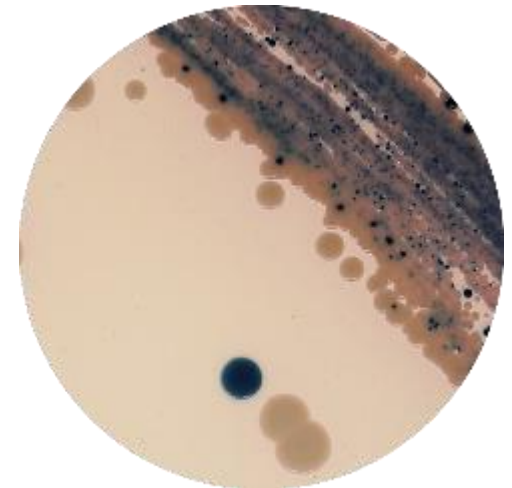
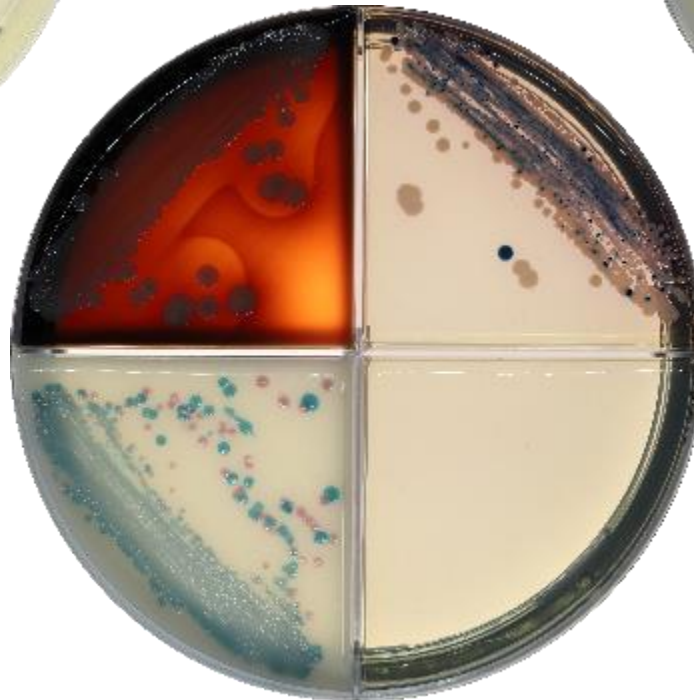
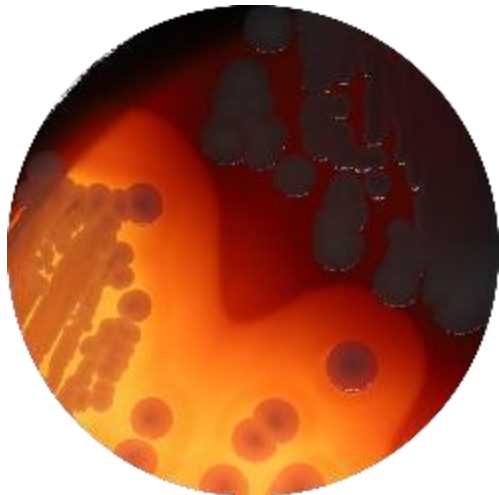
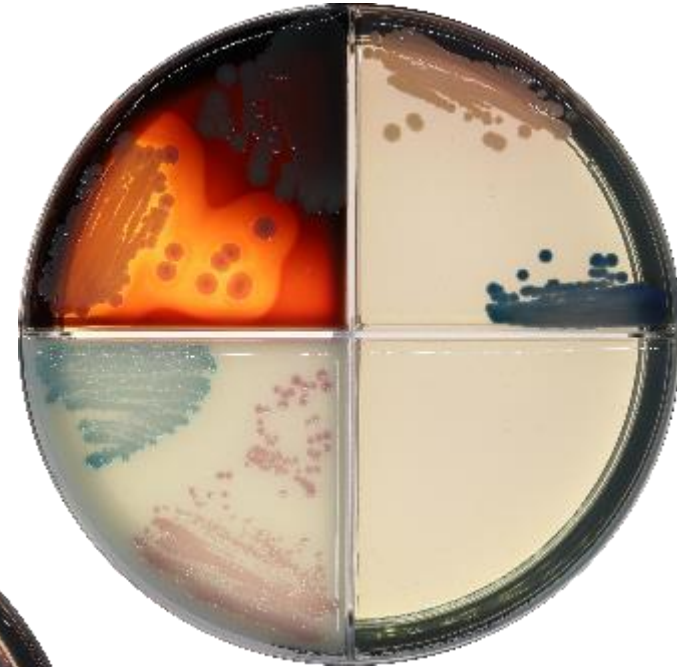
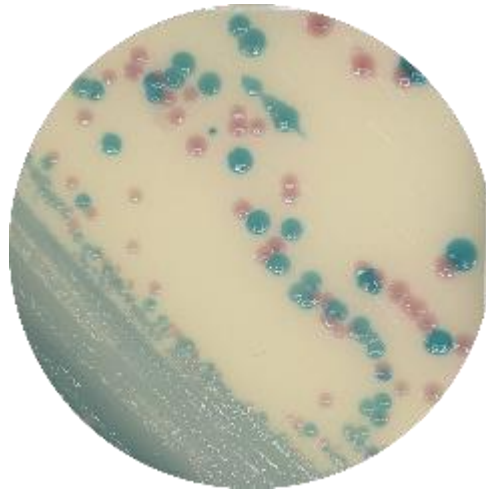
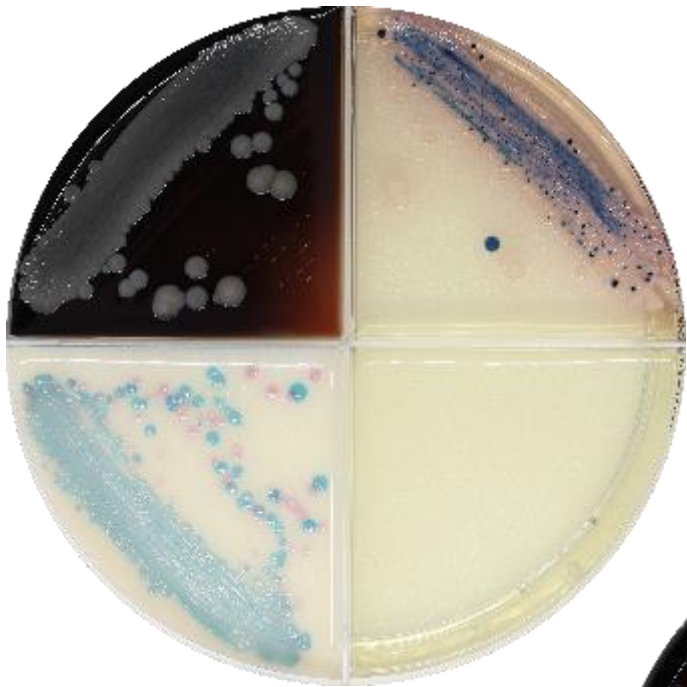


# Chromogenní půdy – směsi

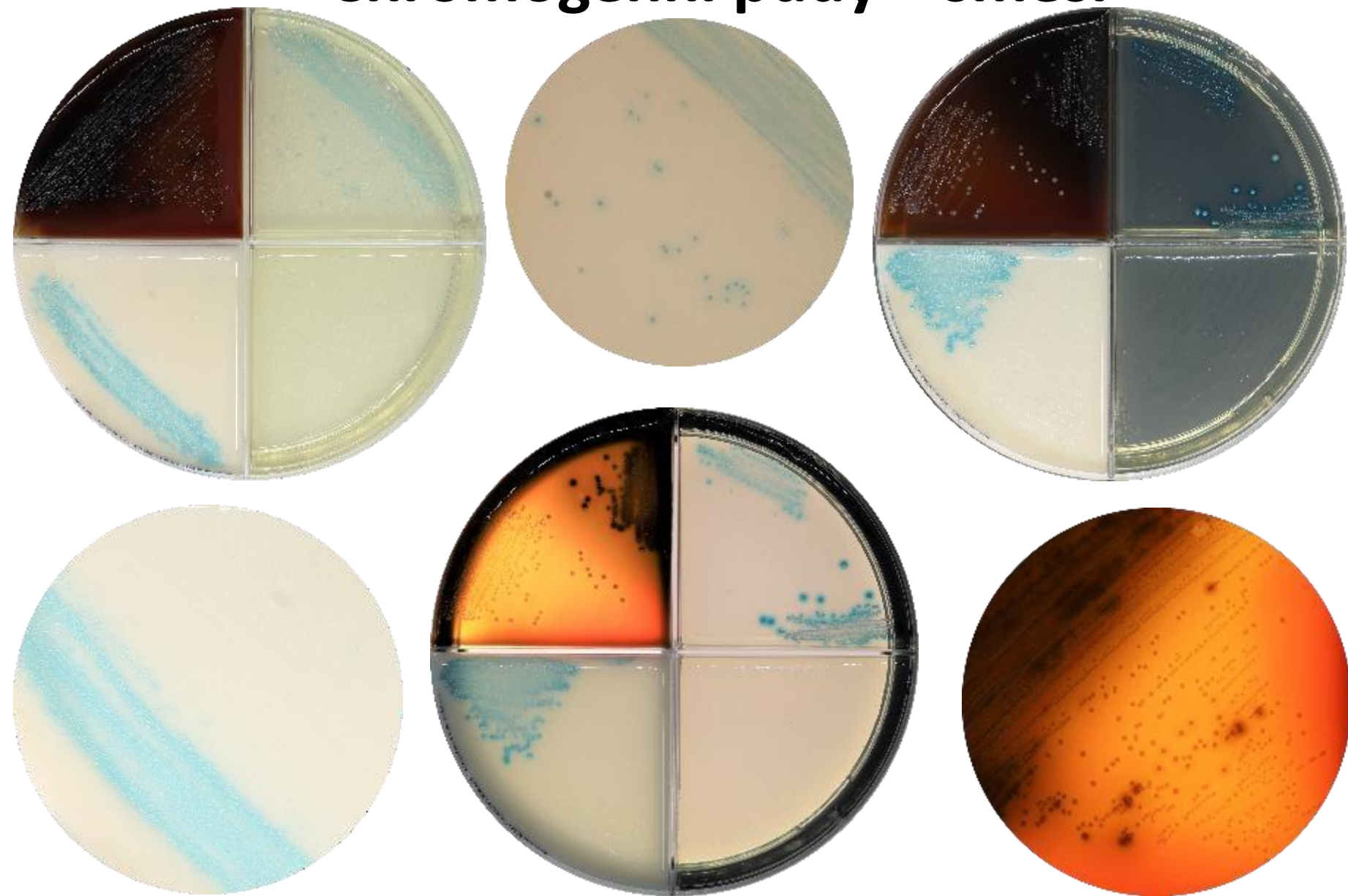




# Chromogenní půdy – směsi

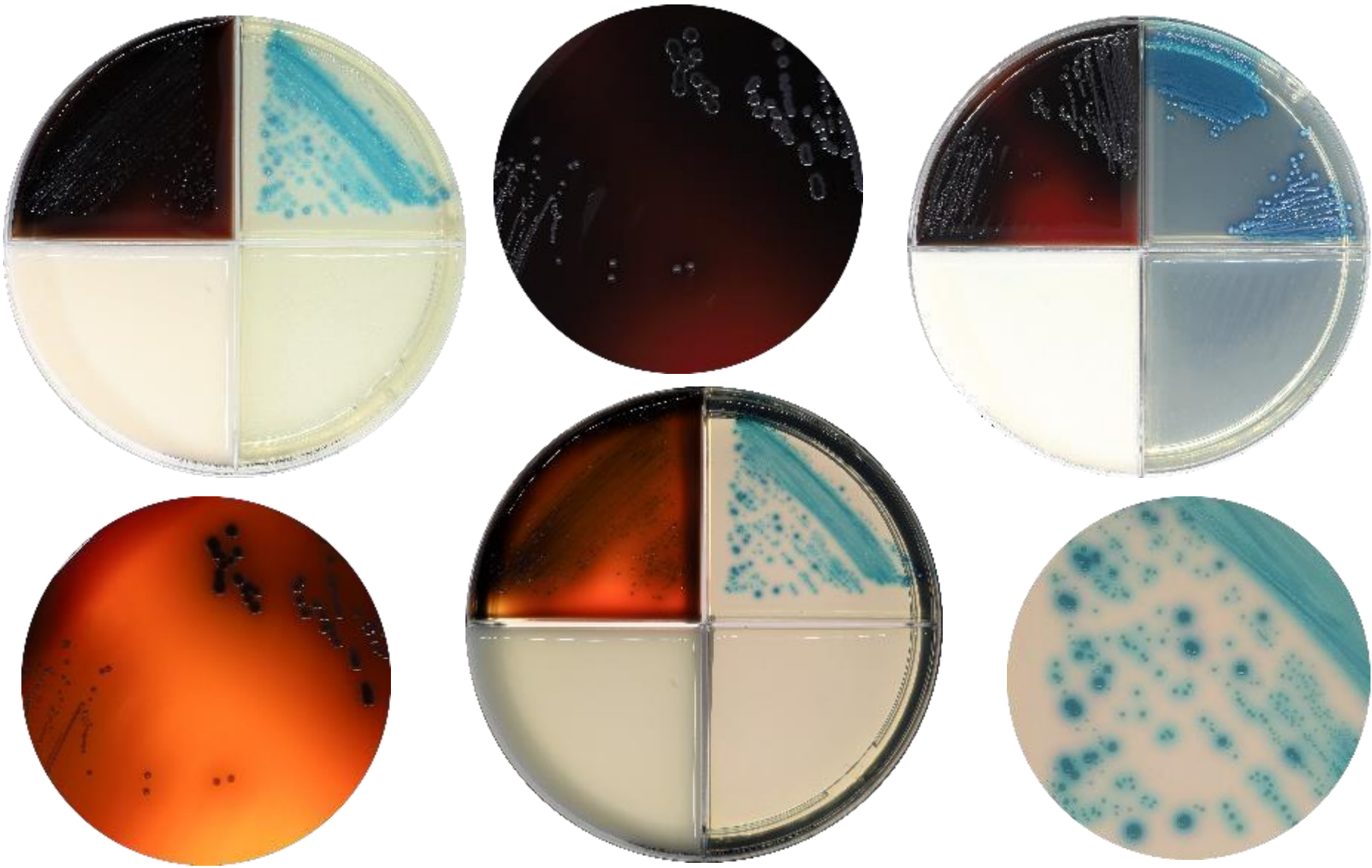


# Chromogenní půdy – směsi

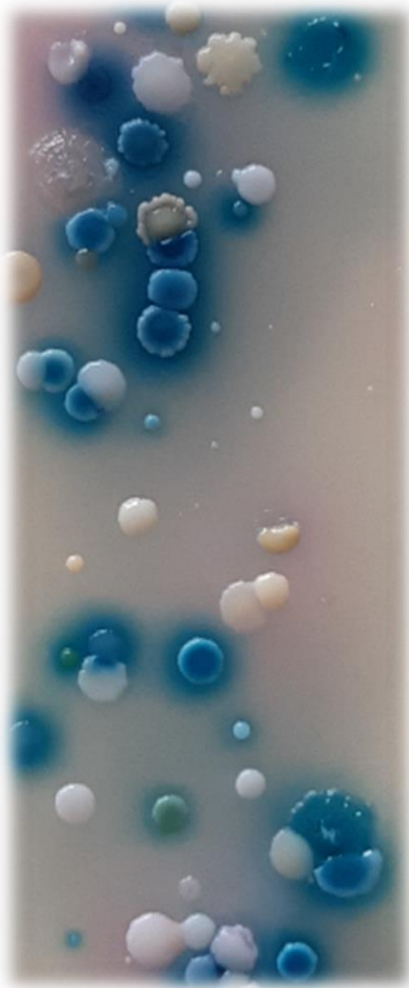




# Chromogenní půdy – směsi



# Původce – patogen ???



*S. haemolyticus*

*S. sciurii*

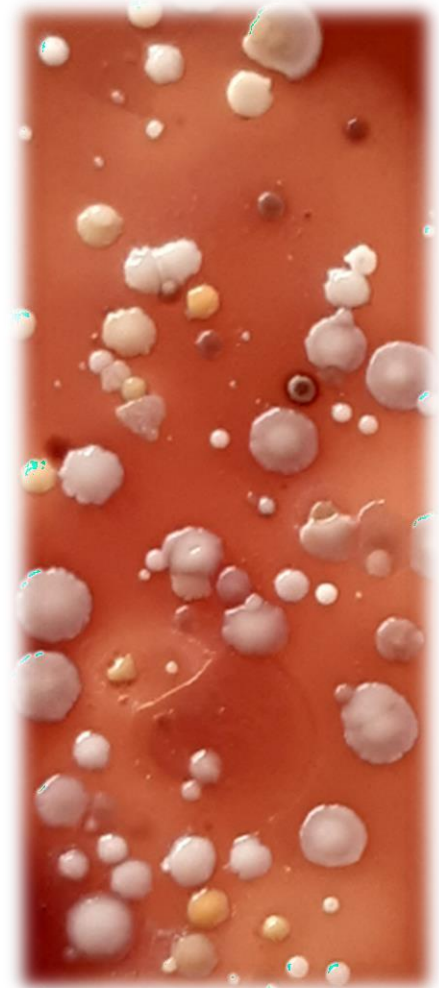
*S. succinus*

*S. xylosus*

*Lactococcus* spp.

*Bacillus* spp.

*Curtobacterium* spp.



# Původce – patogen ???

## Původci kontagiózních mastitid:

- *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *Mycoplasma* spp.

## Původci enviromentálních mastitid:

- KOS, *S. uberis/parauberis*, *Enterococcus* spp., *E. coli*, enterobakterie

## Atypičtí původci mastitid:

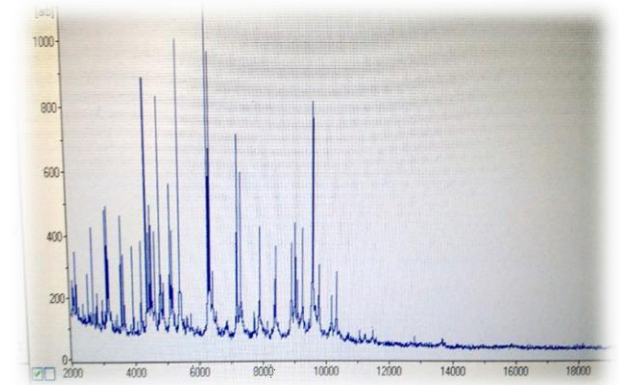
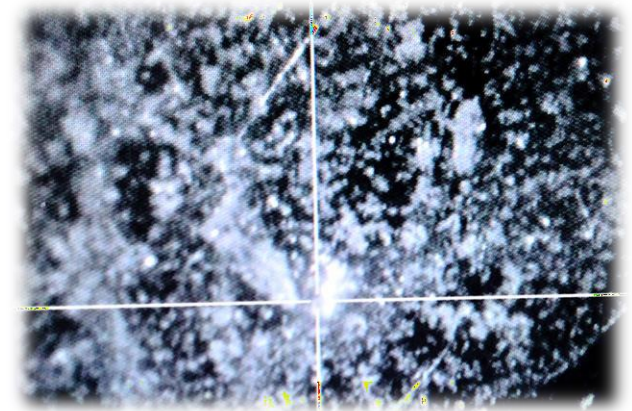
- *T. pyogenes*, *C. bovis*, *P. zopfii*, *P. multocida*, *Serratia* spp.,  
*Nocardia* spp., *S. canis*, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*

## Méně častí původci mastitid:

- *P. aeruginosa*, *Bacillus* spp.(*cereus*), *Aeromonas* spp.,  
*Plesiomonas* spp., kvasinky, plísně

# Identifikace původců -MALDI-TOF

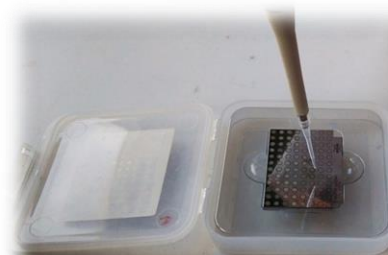
- Rychlá typizace mikroorganismů
- Metody pro přímou identifikaci nárůstu kolonií na plotnách stájové diagnostiky
- Robustní rodové i druhové určení bakterií, kvasinek a plísní
- Rychlý nástroj pro vytvoření stájových vizuálních knihoven



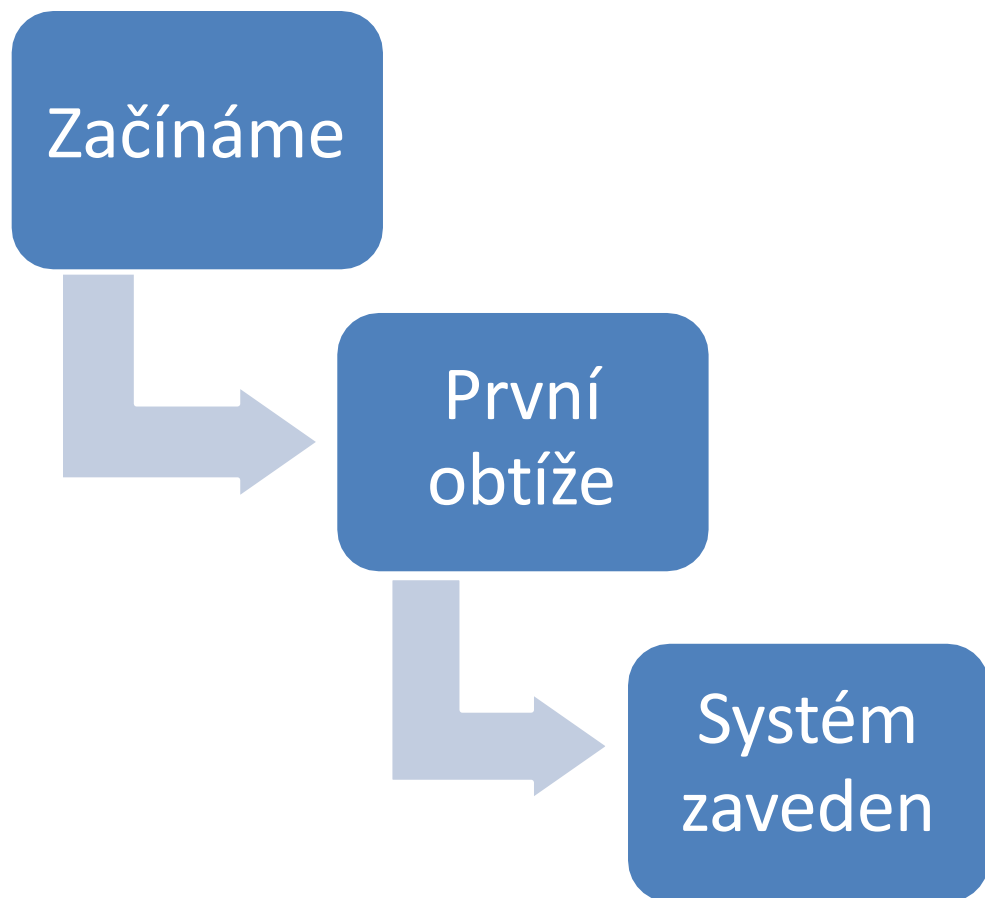
ID	Name	Problem A	Chip	Database/Species	Score	Comment	Description	Validation
2020H	A7	A7	0	Klebsiella pneumoniae	2.124			species <input type="radio"/> genus only <input type="radio"/> unknown <input type="radio"/>
2020M	A8	A8	0	Enterobacter amargosus	2.487			species <input type="radio"/> genus only <input type="radio"/> unknown <input type="radio"/>
2020P	A9	A9	0	Staphylococcus aureus	1.905			species <input type="radio"/> genus only <input type="radio"/> unknown <input type="radio"/>
2020R	A10	A10	0	Staphylococcus aureus	2.119			species <input type="radio"/> genus only <input type="radio"/> unknown <input type="radio"/>
2020S	A11	A11	0	Staphylococcus aureus	2.007			species <input type="radio"/> genus only <input type="radio"/> unknown <input type="radio"/>

Score	Database/Species	Comment	LR
2.287	Staphylococcus aureus DSM 30267 D		1.288
1.987	Staphylococcus aureus DSM 20267 DSM		1.288
1.937	Staphylococcus aureus DSM 4179 DSM		1.288
1.819	Staphylococcus aureus F1		1.288
1.483	Staphylococcus aureus spa_000000 D		202020
1.438	Staphylococcus aureus spa_000000 D		202020
1.392	Staphylococcus aureus spa_000000 D		202020
1.381	Staphylococcus aureus spa_000000 D		202020
1.279	Staphylococcus aureus spa_000000 D		202020
1.020	Staphylococcus aureus spa_000000 D		202020



# Postup racionálního zavedení stájové diagnostiky původců mastitid



**Děkuji za pozornost**