

Pozvánka na Workshop na téma:

Nebakteriální původci mastitid a jejich vliv na kvalitu a technologické vlastnosti mléka – výsledky projektu NEBAKMAS QK1910092 NAZV MZe

Workshop je určen pro vedoucí pracovníky zemědělských podniků s chovem dojnic

Datum konání 21. 10. 2020 - 10:00 až 13:30

Místo konání: Restaurace BOSENKA, Česká Rybná

P R O G R A M

1.	Úvodní slovo – Ing. Petr Roubal, CSc., hlavní řešitel projektu, Výzkumný ústav mlékárenský (VÚM) Praha
2.	Kazuistika eradikace původců mykotických mastitid v chovu dojnic – Ing. Růžena Seydlová, VÚM Praha
3.	Seznámení s laboratorními postupy a výsledky z roku 2019 a 2020, kultivace kvasinek, řas, plísní, jejich identifikace, uchovávání izolátů, výsledky – MVDr. Šimon Friedrich, MVDr. Marek Brychta, MVDr. Ivana Kucharovičová, Státní veterinární ústav Jihlava
4.	Řasa <i>Prototheca</i> jako původce onemocnění lidí a zvířat, detekce v mléce a prostředí pomocí molekulárně biologických metod – Mgr. Monika Morávková, Ph.D., Ing. Romana Bačová, Ph.D., Výzkumný ústav veterinárního lékařství Brno
5.	Účinek dezinfekčních prostředků na biofilm kmenů <i>Candida albicans</i> a <i>Prototheca spp.</i> izolovaných z bazénového kravského mléka – Doc. RNDr. Marcela Klimešová, Ph.D., Ludmila Nejeschlebová, VÚM Šumperk
6.	Složení, vlastnosti a zdravotní ukazatele mléka krav s prototékovou infekcí – Prof. Ing. Oto Hanuš, Ph.D., VÚM Šumperk

Přímá aplikace výsledků řešení projektů V a V a I: MZe RO1420.

Workshop je dílčí aktivitou Odboru živočišné výroby, odborů: OPTT a OVOJP České akademie zemědělských věd.

Poradenství Výzkumného ústavu mlékárenského, Praha.

Vzhledem k vládním protikoronavirovým nařízením a celostátním omezujícím opatřením se workshop uskutečnil elektronicko-korespondenční formou. Příspěvky budou účastníkům zaslány elektronicky a budou vyvěšeny na adrese:

<http://www.vumlekarensky.cz/vyzkum/projekty.html>

Vítáme Vás na workshopu k projektu:

Nebakteriální původci mastitid a jejich vliv na kvalitu a technologické vlastnosti mléka

Projekt Národní agentury pro zemědělský výzkum MZe.

Č. projektu: QK1910092

Akronym: NEBAKMAS

Doba řešení: 2019 - 2023

Workshop projekt NEBAKMAS

Říjen 2020

Řešitelský tým:

Hlavní řešitel – Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

Další účastníci - Státní veterinární ústav Jihlava,

Výzkumný ústav veterinárního lékařství v.v.i.

a MADETA a.s.

Workshop projekt NEBAKMAS

Říjen 2020

Cílem projektu je zmapovat rozšíření nebakteriálních původců mastitid, kvasinek a řasy Prototheca spp., v chovu dojného skotu, shromáždit informace o jejich vlivu na technologické vlastnosti mléka a navrhnout chovatelům soubor opatření vedoucích ke snížení výskytu daných agens v chovech a následně i v mléce, jakožto surovině pro výrobu kvalitních a bezpečných potravin. Následným cílem pak je vyloučit aplikaci antibiotik, která jsou proti těmto agens neúčinná, a tím zvýšit kvalitu, respektive bezpečnost produkce mléka, dosáhnout významné ekonomické úspory a snížit výskyt antibiotické rezistence u bakterií vyskytujících se v chovech skotu, a tím i v potravinovém řetězci.



Ing. Růžena Seydlová, VÚM Praha

Kazuistika eradikace řasy *Prototheca* spp. v chovu

• Říjen 2020

Původci nebakteriálních mastitid

Kvasinky

Množí se při teplotě v mléčné žláze -
Candida krusei, *C. rugosa*, *C. parapsilosis*
C. albicans
C. lusitanae
Geotrichum candidum
Cryptococcus neoformans



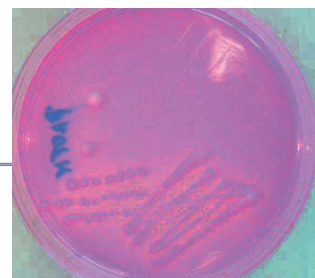
Plísně

- *Aspergillus fumigatus*
- *Mucor* sp.



Bezbarvé řasy

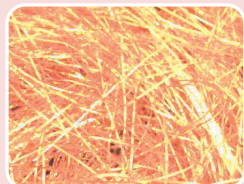
- *Prototheca zopfii*
- *P. blaschkeae*, *stagnora*, *ulmea*, *wickerhamii*, *cutis*, *miyajii*



Zdroj infekce



Krmivo



Stelivo



Výkaly

- separát
- digestát



Voda



Zbytky mléka ve strukových návlečkách po podojeních pozitivní dojnice = jeden z nejpodstatnějších zdrojů



Hlavní zdroje



Souběh faktorů pro vznik nebakteriálních mastitid

Chronicky snížená imunita dojnic

Dlouhodobá zátěž organismu mykotoxiny v krmivech

Léčení mastitidních dojnic bez stanovení původce a antibiogramu

Dlouhodobá/opakovaná ATB léčba

Nehygienická příprava mléčné žlázy na dojení

Nevhodný režim dojení

Nedostatečná kvalita ustájení

Významná absence desinfekčních opatření ve stáji

Dlouhodobá produkční zátěž dojnic (vysoká užitkovost)

Formy projevu nebakteriálních mastitid

Klinické
(akutní,
chronické)



Subklinické



Latentní

- Závisí na denzitě patogenu, celkovém zdravotním stavu dojnic a úrovni imunosuprese

Záchyty *Prototheca* sp.

0,7 - 5
%

bazénové
vzorky

až 40 %

plošný
screening
stáda

Primárně nejsou diagnostikovány

Dlouhá kultivace – 3-5 dnů

Validace nálezu – PCR, MALDI TOF

Terénní zkušenost z deseti farem z hlediska eradikace

Základní charakteristika zástupců patogenů

	kvasinky	plísně	řasy
Nulová citlivost na ATB	✓	✓	✓
Zoonóza	✓	×	✓
Produkce proteolytických a lipolytických enzymů	✓	✓	✓
Reakce enzymů na pasterační teploty	termolabilní	termolabilní	termostabilní
Utilizace laktózy	✓	✓	✓
Schopnost tvorby biofilmu	✓	×	✓
Vliv na PSB	✓	✓	+/-
Eradikace z chovu	měsíce	měsíce	měsíce-roky

Klinické projevy závisí na koncentraci patogenů (otoky mléčné žlázy, ztráty produkce, horečka, úhyn).

Závěr

Léčení ATB
neexistuje

Preventivní
opatření = zásadní
podpora imunity

Kontrola možných
zdrojů



Individuální mykologická diagnostika

Stěry, spady

Odklizení výkalů

Podestýlka

Materiál na stlaní

Stěry z mulce a vnějších pohlavních orgánů

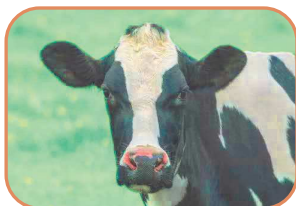
Kontrola účinnosti desinfekčních prostředků na ošetření podestýlky

Kontrola predipů a postdipů

Základní charakteristika stáda (10/2019-11/2020)



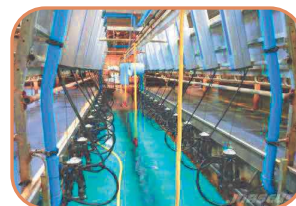
400 produkčních
dojnic



Plemeno
Holštýn



Materiál na
stlaní – sláma



Dojírna – 2×12



Liberecký kraj



Základ pelechů –
hnůj



Odchov jalovic
na pastvě



Zjištěná vysoká
pozitivita dojnic

Počáteční stav na farmě – říjen 2019

- Dva roky problémů s léčením dojnic
- Zkrmování mastitidního mléka telaty
- Stáj dlouhodobě nedesinfikovaná
- Základ pelechů tvoří hnůj, dostýlané slámou a pilinami
- Dojnice se telí na hluboké podestýlce
- Mastitidní dojnice nejsou vytříděné do extra sekce
- Dojnice paušálně zaprahovány
- Nadbytečné používání vody na dojírně
- Individuální dojící jednotky se nedesinfikují mezi dojeními
- Provádí se faremní kultivace bez validace
- Mikrobiologická diagnostika celého stáda se nikdy nedělala

Výsledky výchozího mykologického vyšetření individuálních vzorků dojnic (22.10.2019 – 24.2.2020)

- Celkově hodnoceno 452 dojnic
- Doprovodná mikroflóra – kvasinky (*Candida crusei*) a plísně

negativní	<i>Prototheca</i> spp.		
	+	++	+++
318	30	33	71
70,4 %	6,6 %	7,3 %	15,7 %
70,4 %	29,6 %		

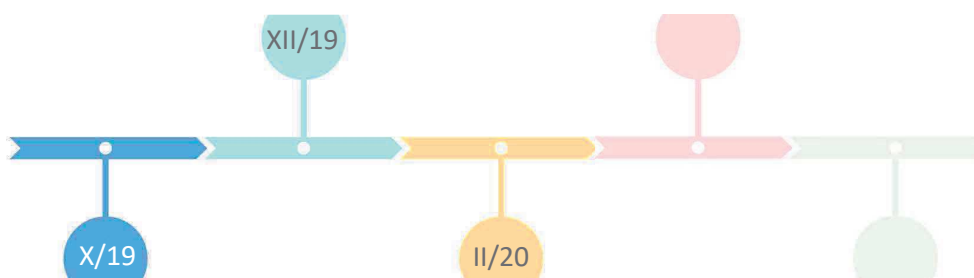
Ozdravná opatření k 1.12.2019

- ✓ Okamžitá likvidace pelechů
- ✓ Instalace slámových matrací k 19.11.2019
- ✓ Vytřídění všech pozitivních dojnic do jedné sekce
- ✓ Individuální posouzení perspektivy pozitivních dojnic (jatka, předčasné zaprahnutí)
- ✓ Označení všech pozitivních dojnic na kartách
- ✓ Instalace ruční sprejové mezidesinfekce na dojrně
- ✓ Pravidelná desinfekce stáje
- ✓ Vybílení stáje
- ✓ Zákaz zkrmování mastitidního mléka telatům
- ✓ Zákaz nadměrného používání vody na dojrně
- ✓ Oddojování prvních stříků výhradně do hrníčku
- ✓ Změna režimu zaprahnování pozitivních dojnic
- ✓ Začátek zkrmování Butycelu (Bodit Tachov)



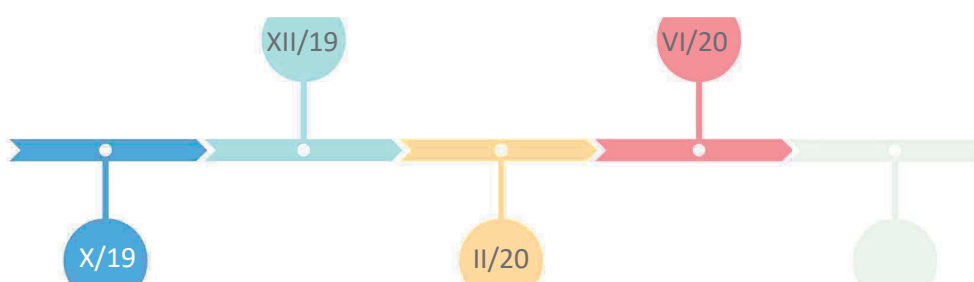
Ozdravná opatření k 1.2.2020

- ✓ Kontrola všech otelených dojnic na diagnostiku řasy před zařazením do stáda
- ✓ Mikrobiologická kontrola účinnosti ruční mezidesinfekce
- ✓ Chemický rozbor vody
- ✓ Mykologický rozbor komponentů krmné dávky
- ✓ Posouzení kvality přípravy mléčné žlázy na dojení



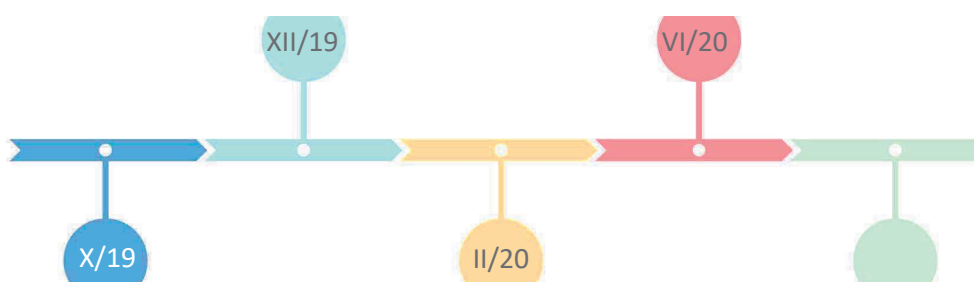
Ozdravná opatření k 1.6.2020

- ✓ Oddělené dojení mastitidních dojnic s bakteriologickým a/nebo mykologickým nálezem původce
- ✓ Využití extra desinfektoru na dojírně pro dojnice s nálezem *Prototheca* spp.
- ✓ Desinfekce stáje jedenkrát za 14 dní



Finální stav

- 26.8.2020 Všechny pozitivní dojnice jsou otelené (*Prototheca* spp.)
- 1.9.2020 Zrušení hluboké podestýlky na porodně, hloubková desinfekce porodny
- 15.10.2020 Likvidace sekce dojnic s nálezem *Prototheca* spp.
Likvidace podestýlky v pozitivní sekci a zásadní desinfekce



Výsledky mykologického vyšetření individuálních vzorků mléka dojnic (27.5.-7.10.2020)

negativní	<i>Prototheca</i> spp.		
	+	++	+++
363	5	4	5
96,3 %	1,3 %	1,1 %	1,3 %
96,3 %	3,7 %		

- Nulová diagnostika kvasinek a plísní
- Nález *Prototheca* spp. byl z individuálních vzorků negativní otelených dojnic od 22.7.2020

Mikrobiologické rozbory vzorků ze stáje

1. Rozbor vody – mykologický nález negativní
2. Chemický rozbor vody – nález SiO_2
3. Rozbor krmných komponentů – kvasinky 10^1 - 10^7 , plísně <10 - $2,8 \times 10^3$, *Prototheca* sp. <10
4. Výkaly, piliny, podestýlka - kvasinky 10^2 - 10^6 , plísně 10^3 - 10^4 , *Prototheca* sp. 0 - 10^1
5. Mikrobiologické stěry z prostředí - *Prototheca* sp. 0

Výsledek mykologického vyšetření *Prototheca zopfii* v orgánech a tkáních poražených dojnic (02/2020)

- Tři pozitivní dojnice
- Jatka Polička



	+	++	+++
Jazyk stěr	✓		
Jazyk tkáň			
Vaječník	✓✓✓		
Parenchym mléčné žlázy		✓✓	✓
Struková část mléčné cisterny			✓
Strukový kanálek			✓
Poševní výtěr		✓	

Souhrn výsledků z KU farmy - MPD

I. etapa

- Počáteční stav (05-09/2019)

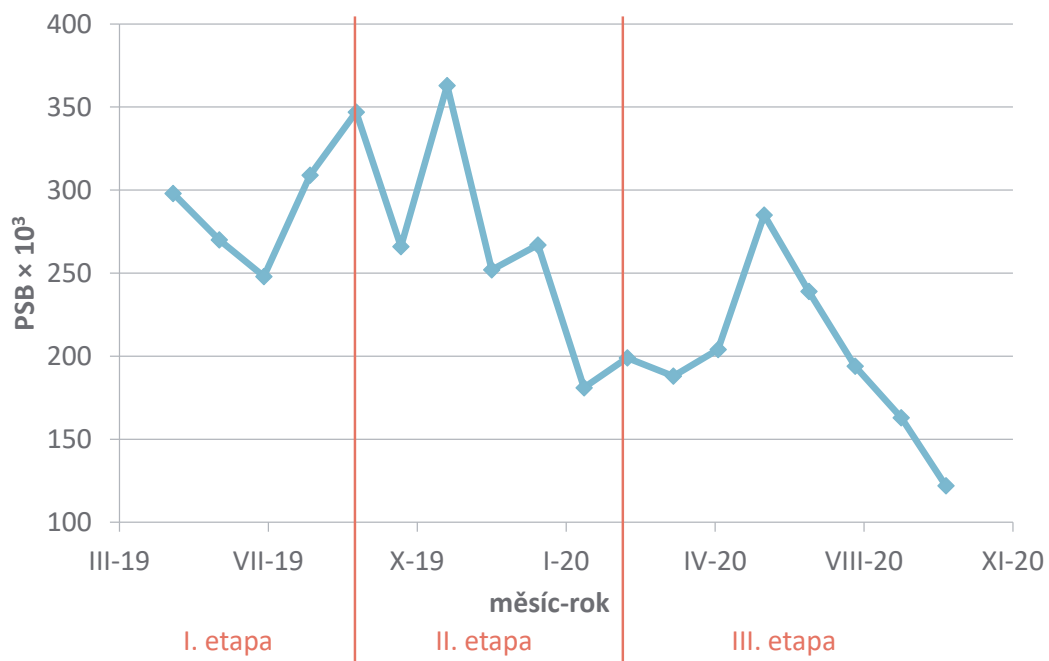
II. etapa

- První fáze opatření (10/2019-05/2020)

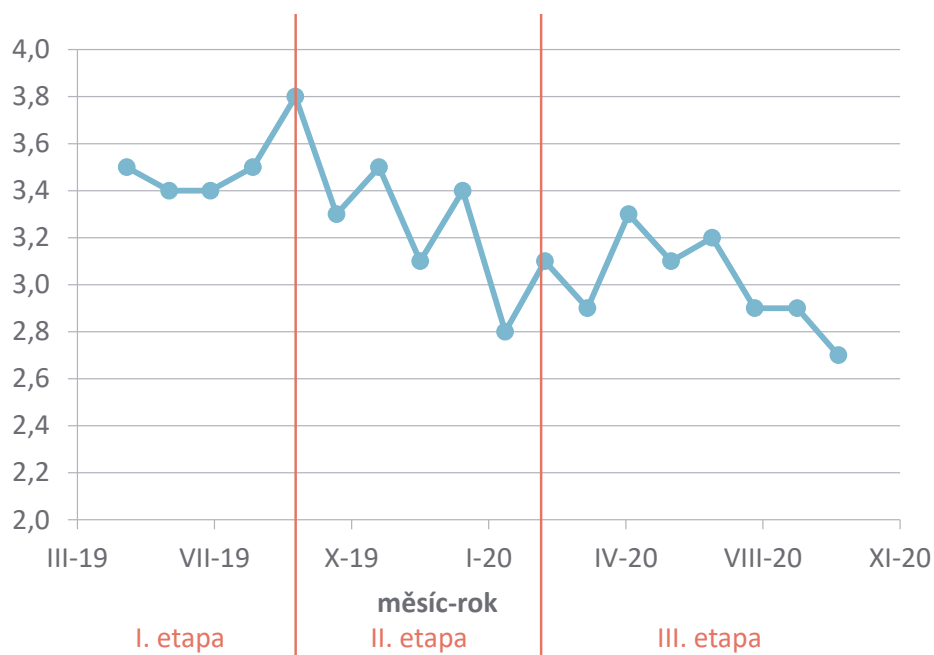
III. etapa

- Druhá a třetí fáze opatření (06/10/2020)

Vývoj počtu somatických buněk v procesu eradikace



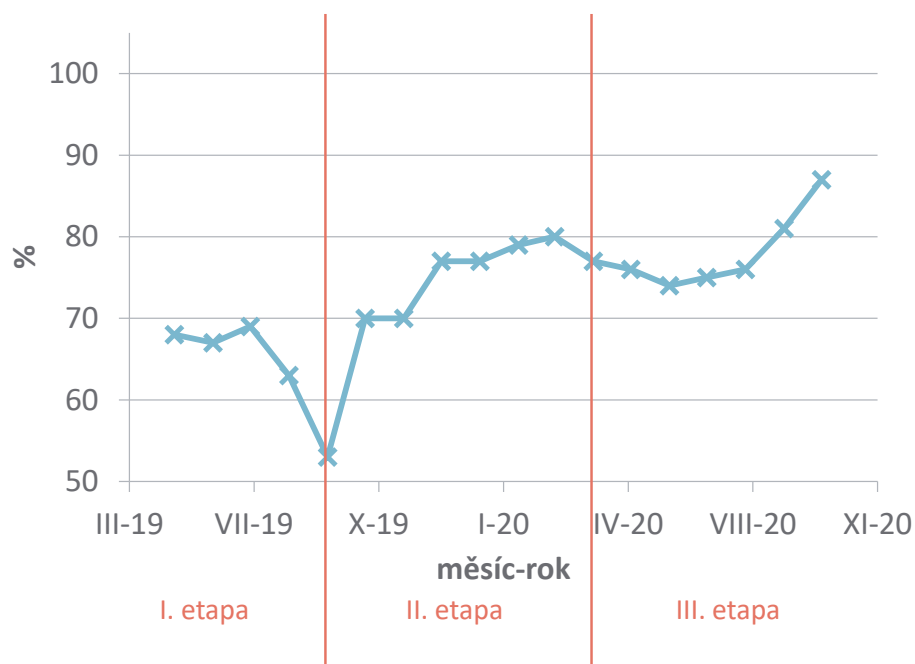
Vývoj lineárního skóre v procesu eradikace



Vývoj úspěšnosti zaprahování v procesu eradikace



Vývoj % dojnic s PSB do 200 tis. v procesu eradikace



Ing. Růžena Seydlová
seydlova@milcom-as.cz
Tel. +420 602 140 858



Zpracováno v rámci řešení projektu NAZV QK1910092.



Státní
veterinární
ústav
Jihlava



Seznámení s laboratorními postupy a výsledky z roku 2019 a 2020

Kultivace kvasinek, řas, plísní, jejich identifikace, uchovávání izolátů, výsledky

Friedrich Š., Brychta M., Kucharovičová I., Státní veterinární ústav Jihlava

*Program: QK 1910092 – Program aplikovaného výzkumu Ministerstva zemědělství na období 2017 – 2025, ZEMĚ
Doba řešení: 1/2019 – 12/2023*

PROJEKT NAZV – NEBAKTERIÁLNÍ PŮVODCI MASTITID A JEJICH VLIV NA KVALITU A TECHNOLOGICKÉ VLASTNOSTI MLÉKA

**WORKSHOP – setkání chovatelů dojného skotu
se zástupci výzkumných pracovišť
21. – 22. 10. 2020**



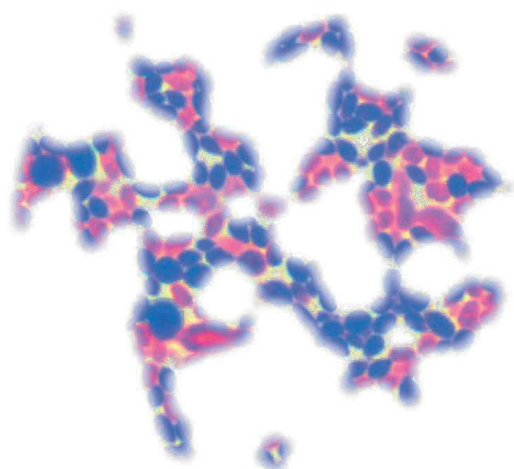
ÚKOL SVÚ JIHLAVA ZÍSKAT Z BAZÉNOVÝCH VZORKŮ MLÉKA:

- *IZOLÁTY KVASINEK, ŘAS*
- *ZJISTIT JEJICH POČET V 1 ml*
- *IDENTIFIKOVAT DRUHY PLÍSNÍ (dodané z laboratoře VEDIA Strakonice)*
- *VYTVOŘIT SBÍRKU IZOLÁTŮ*
- *POSKYTNOUT KMENY PRO DALŠÍ VÝZKUM (VÚVeL Brno, VÚM Praha, Šumperk)*

3



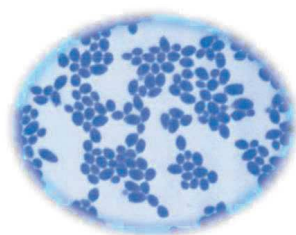
CHARAKTERISTIKA KVASINEK, ŘAS A PLÍSNÍ



4



KVASINKY:

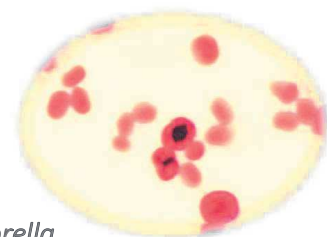


- ✓ Jsou jednobuněčné eukaryotické organismy. Jsou komenzály kůže a sliznic, vyskytují se v podestýlce, pivovarském mlátu (WINTER, 2009), mají široké biotechnologické využití.
- ✓ Izolovány z kravského mléka byly poprvé roku 1901 (PENGOV, 2002) – *Candida krusei*, *Candida albicans*, *Candida kefyr*, *Candida rugosa*.
- ✓ Výskyt často souvisí s předchozí léčbou kortikosteroidy a antibiotiky.
- ✓ Z hlediska technologického zpracování mléka – naruší svojí enzymatickou aktivitou sensorické vlastnosti mléka a mléčných výrobků.

5



ŘASY:



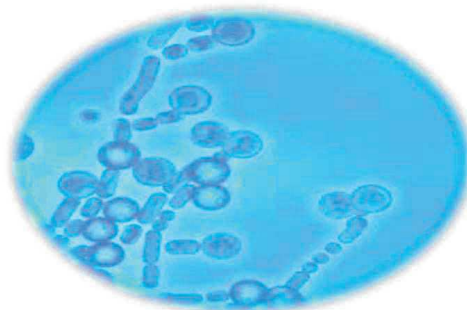
- ✓ Z rodu *PROTOTHECA* – jednobuněčné, nezelené organismy příbuzné rodu *Chlorella*.
- ✓ Vyskytují se ubikvitárně v prostředí na vlhkých místech (napajedla), v organickém materiálu (půda), v krmných žlabech (RAPUNTEAN, 2009, WINTR, 2009).
- ✓ V současné době 6 druhů.
- ✓ Onemocnění u lidí způsobuje *P. wickerhamii*.
- ✓ Onemocnění zvířat – *P. bovis* (dříve *P. zopfii* genotyp II) a *P. ciferrii* (dříve *P. zopfii* biotyp 3) - původci mastitid (ARNHOLDT, 2012).

6



PLÍSNĚ:

- ✓ *Plísně jsou mikroskopické vláknité houby.*
- ✓ *Jsou velmi nenáročné na živiny.*
- ✓ *Pro svůj růst vyžadují především vlhkost.*
- ✓ *Z mléčné žlázy byl izolován *Aspergillus fumigatus* – vyskytující se v prostředí – zaplísněné podestýlce, v krmivu.*
- ✓ *Další významnou plísní je rod *Mucor*.*



7



LABORATORNÍ POSTUPY:

- ✓ *vycházejí z faktu, že pracujeme s živými mikroorganismy*
- ✓ *proto jim musíme vytvořit vhodné podmínky pro jejich růst (izolaci a identifikaci)*

8



RŮST - KULTIVACE: VÝŽIVA + TEPLOTA + ATMOSFÉRA + ČAS

VÝŽIVNÁ KULTIVAČNÍ MÉDIA – SELEKTIVNÍ PEVNÉ PŮDY

- ✓ *Sabouradův agar s dextrózou*
- ✓ *Desoxycholátový agar s dichloranem a bengálskou červení (pro počty kvasinek a řas)*
- ✓ *PIM - Prototheca isolation medium*



9



TEPLOTA:



- ✓ *Inkubace kvasinek a řas: 37°C, 25°C s odchylkou ± 1°C*
- ✓ *Inkubace plísni: 37°C, 25°C s odchylkou ± 1°C*



10



ATMOSFÉRA:

✓ *Za přístupu kyslíku - aerobní*



11



POSOUZENÍ, IZOLACE A IDENTIFIKACE:

✓ *První posouzení po 3 dnech, konec kultivace po 5 dnech – kvasinky, řasy; plísňe až 7 dní*



12



DOBA KULTIVACE:

POSOUZENÍ: MAKROSKOPICKÉ – velikost, tvar, barva, vůně ..., výběr kolonií - IZOLACE

IZOLACE – cílem je získat čistou kulturu (kmen kvasinky, řasy), následuje kultivace za stejných podmínek jako u původní kultivace

IDENTIFIKACE:

- ✓ *MIKROSKOPICKY – barvení preparátů dle Grama, fenylovou modří*
- ✓ *Metodou MALDI – TOF*
- ✓ *NEIDENTIFIKOVANO KMENY KVASINEK A PROTOTHECA sp. – byly využity metody molekulárně biologické – PCR – VÚVeL Brno – tým MVDr. M. Morávkové, Ph.D.*



13



UCHOVÁVÁNÍ KMENŮ KVASINEK, ŘAS, PLÍSNÍ A DISTRIBUCE OSTATNÍM VÝZKUMNÝM PRACOVÍŠTÍM:

- ✓ *ITEST KRYOBANKA K (komerčně vyráběné) pro kvasinky a řasy*
- ✓ *Plísňe – na šikmých agaroch, distribuce se připravuje*



14



NEJČASTĚJI DETEKOVANÉ KVASINKY - 2019:

	Počet bazénových vzorků	Výskyt kvasinek	Počet druhů kvasinek	Nejčastěji detekované druhy kvasinek (> 3%)
Mlékárna č. 1	90	82 (91,1%)	13	C. kefyř, C. inconspicua, C. krusei, C. lambica, C. parapsilosis, C. rugosa
Mlékárna č. 2	71	67 (94,3%)	20	C. kefyř, C. inconspicua, C. krusei, C. parapsilosis, C. pararugosa, C. utilis, C. lambica, C. rugosa
Mlékárna č. 3	38	38 (100%)	16	C. kefyř, C. inconspicua, C. krusei, Y. lipolytica, C. parapsilosis, G. silvicola, C. lambica
Mlékárna č. 4	67	64 (95,5%)	28	C. kefyř, C. krusei, C. inconspicua, C. parapsilosis, Y. lipolytica, G. capitatum, C. zeylanoides, G. silvicola, C. pararugosa, C. utilis, C. guilliermondii, R. mucilaginosa
CELKEM	266	251 (94,4%)	37	-

15



VÝSLEDKY VYŠETŘOVÁNÍ BAZÉNOVÝCH VZORKŮ MLÉKA – KVASINKY - 2020:

	Počet bazénových vzorků	Počet pozitivních vzorků	Počet pozitivních vzorků %	Počet identifikovaných druhů
Mlékárna č. 1	96	93	96,9	28
Mlékárna č. 2	15	13	86,7	21
Mlékárna č. 3	14	14	100	14
Mlékárna č. 4	86	85	98,8	26
Mlékárna č. 5	35	34	97,1	22
Mlékárna č. 6	7	7	100	18
CELKEM	253	245	96,4%	48

16



NEJČASTĚJI DETEKOVANÉ KVASINKY - 2020:

	Počet identifikovaných druhů	Nejčastěji detekované druhy kvasinek (> 3%)
Mlékárna č. 1	28	C. kefyř; C. krusei; C. inconspicua; C. lambica; C. parapsilosis; G. capitatum; G. silvicola; R. mucilaginoso; C. pararugosa; C. tropicalis; S. clavata; C. famata; C. guilliermondii; C. lusitaniae; Exophila dermatitidis; Pichia cactophila; Y. lipolytica
Mlékárna č. 2	21	C. inconspicua; C. kefyř; C. parapsilosis; C. pararugosa; C. albicans; C. krusei; G. capitatum; G. silvicola
Mlékárna č. 3	14	C. inconspicua; C. kefyř; C. krusei; Geotrichum capitatum; C. parapsilosis; Trichosporon montevidense
Mlékárna č. 4	26	C. kefyř; Candida krusei; C. inconspicua; C. parapsilosis; C. lambica; C. pararugosa; Yarrowia lipolytica; C. rugosa; Geotrichum silvicola; Geotrichum capitatum; C. intermedia; C. utilis; Kluyveromyces lactis
Mlékárna č. 5	22	Candida kefyř; C. inconspicua; C. krusei; Yarrowia lipolytica; C. parapsilosis; Kluyveromyces lactis; C. pararugosa; C. zeylanoides; Geotrichum capitatum; C. catenulata; C. lambica; C. famata; C. lusitaniae; C. rugosa; Trichosporon ovoides
Mlékárna č. 6	18	C. kefyř; C. lambica; C. parapsilosis; C. intermedia; C. krusei; C. pararugosa; Y. lipolytica; C. inconspicua; C. zeylanoides; C. famata; C. rugosa; C. tropicalis; G. silvicola; K.lactis; Pichia manshurica; S. clavata; T. faecale; Wicrehamomyces anomalus

17



VÝSLEDKY VYŠETŘOVÁNÍ BAZÉNOVÝCH VZORKŮ MLÉKA – PROTOTHECA - 2020 :

	Počet bazénových vzorků	Počet pozitivních vzorků	Počet pozitivních vzorků %
Mlékárna č. 1	96	2	2,1
Mlékárna č. 2	15	1	6,7
Mlékárna č. 3	14	0	0,0
Mlékárna č. 4	86	5	5,8
Mlékárna č. 5	35	8	22,9
Mlékárna č. 6	7	0	0,0
CELKEM	253	16	6,3%

18



VÝSLEDKY KVANTITATIVNÍHO VYŠETŘENÍ KVASINEK - 2020 :

Počet KTJ/ml v řádu	Počet vzorků
10^1	64
10^2	93
10^3	63
10^4	25
10^5	1
CELKEM VZORKŮ	245

19



VÝSLEDKY KVANTITATIVNÍHO VYŠETŘENÍ PROTOTHECA sp. - 2020 :

Počet KTJ/ml v řádu	Počet vzorků
10^1	14
10^2	2
10^3	1
10^4	0
10^5	0
CELKEM VZORKŮ	17 ???

20



VÝSLEDKY VYŠETŘOVÁNÍ BAZÉNOVÝCH VZORKŮ MLÉKA – PLÍSNĚ - 2020:

	Počet izolátů	Identifikované plísně
Mlékárna č. 1	10	Didymella aurea, Epicoccum sorghinum, Fusarium oxysporum, Penicillium spp., Penicillium citrinum, Conyochaeta mutabilis, Cladosporium herbarum
Mlékárna č. 2	0	-
Mlékárna č. 3	0	-
Mlékárna č. 4	3	Penicillium digitatum, Fusarium solani, Penicillium commune
Mlékárna č. 5	1	Aspergillus niger
Mlékárna č. 6	2	Coniochaeta mutabilis (2x)

21

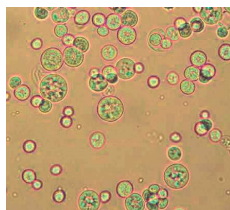
Děkujeme za pozornost



Státní veterinární ústav Jihlava
State Veterinary Institute Jihlava

Rantířovská 93/20 | 586 05 Jihlava | ČR
T: 567 143 111 | E: info@svujihlava.cz | www.svujihlava.cz

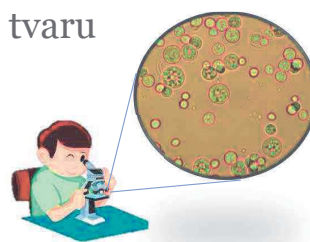
Řasa *Prototheca* jako původce onemocnění lidí a zvířat, detekce v mléce a prostředí pomocí molekulárně biologických metod



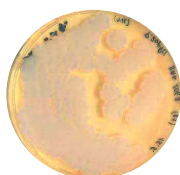
Mgr. Monika Morávková, Ph.D., Ing. Romana Bačová, Ph.D.
Výzkumný ústav veterinárního lékařství Brno, v.v.i.

Základní charakteristika prototék

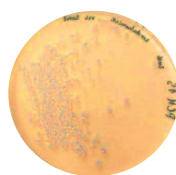
- » **Jednobuněčná a bezbarvá řasa** oválného tvaru
 - » viditelná pouze mikroskopicky
- » Tvoří **endospory**, kterými se rozmnožuje
- » Lze **kultivovat** na mikrobiologických půdách
 - » roste na stejných médiích jako kvasinky okoskopicky lze s nimi zaměnit



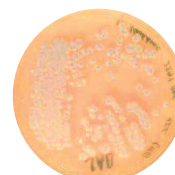
Candida lambica



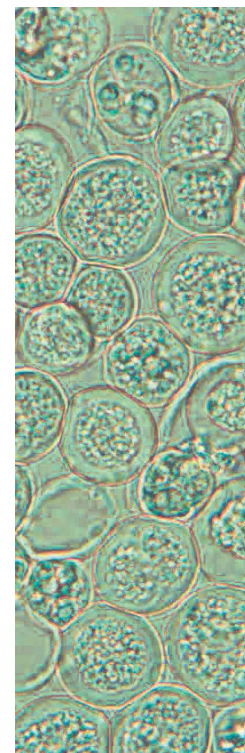
P. bovis



P. bovis



P. blashkeae



Vlastnosti prototék

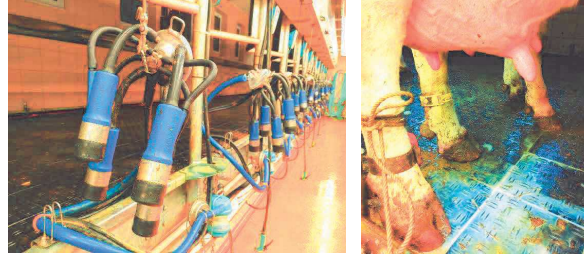
- » Významná **produkce biofilmu**
- » **Vyšší rezistencí k antimikrobiálním látkám**
- » Může **přežívat pasterační teploty**

Taxonomie

- » Do této doby popsáno přes 14 druhů
- » Nejvýznamnější druhy
 - » ***Prototheca wickerhamii*** – nejčastěji původce onemocnění lidí
 - » ***P. zopfii* genotyp 2** (nověji označován jako *P. bovis*) – nejčastější původce mastitid skotu
 - » ***P. blaschkae*** – mastitidy skotu
 - » ***P. zopfii* genotyp 1** (nověji *P. ciferii*) – prostředí farem, považován spíše jako nepatogenní

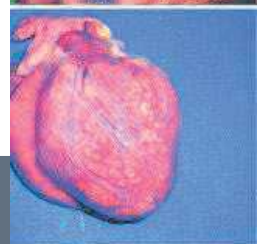
Výskyt

- » **Vlhké prostředí** s vyšším množstvím organické hmoty (hnůj, odpadní vody, žlaby, krmivo, půda, voda atd.) – kde se za zvýšené teploty pomnožuje
- » **Dojící zařízení** – tvorba biofilmu
- » **Výkaly** infikovaných zvířat
- » **Mléko** infikovaných krav



Infekce zvířat

- » Oportunní infekce spojené s oslabením imunitního systému
- » Nejčastěji je infekce zaznamenána u skotu, méně často psů
- » Zatímco u krav je predominantní formou mastitida, u psů má infekce těžší průběh, projevuje se jako systematické onemocnění zahrnující řadu orgánů (např. játra, ledviny, mozek)
- » Infekce ale byla zaznamenána i koček, kde se spíše objevují kožní projevy, koz, ryb a koní (respirační infekce)



Prototéková mastitida skotu

- » Klinická a subklinická forma
 - » zpočátku je infekce v chovu subklinická a je obtížné ji v chovu odhalit
- » Akutní nebo chronická
- » Infekce způsobuje postupný pokles produkce mléka v postižení čtvrti, což je dáno nenávratným poškozením tkáně mléčné žlázy
- » Postupně dochází ke změně konzistence mléka (mléko vodovité s vločkami a hrudkami
- » U některých případů může být pozorována bolestivost a otok vemene

Prototéková mastitida skotu

- » Počet somatických buněk může být v počáteční fázi nezměněn, později dochází u některých kusů až k extrémnímu navýšení kolem milionu somatických buněk na mililitr mléka
- » **Predispoziční faktory – narušení imunitního systému**
 - » předešlá bakteriální mastitida a její léčba ATB může zvyšovat riziko infekce
 - » špatná hygiena chovu
 - » mechanické poškození mléčného kanálků
- » Léčba – **onemocnění nezle vyléčit**, doporučuje se vyřazení infikovaného kusu z chovu X kvasinkové infekce, u kterých pozorováno i samovolné vyléčení

Prototéková mastitida skotu

» Přenos

- » Přes otevřený strukový kanálek z prostředí s vysokou kontaminací prototéky
- » Prostřednictvím kontaminované dojící techniky
- » Prototéka vylučována mlékem a trusem do prostředí

» Rozšíření a prevalence

- » Celosvětové rozšíření
 - » Kanada – 6% chovů pozitivních na přítomnost prototéky
 - » Polsko – celková prevalence pozitivních krav kolem 8 %
 - » prevalence prototék v chovu může být kolem 30 % a více procent, v průměru kolem 5 %



Infekce lidí

- » **Sporadické infekce** – zaznamenáno pouze několik případů ročně
- » Postihuje především **osoby s oslabenou imunitou** tzn. s dalším závažným onemocněním (např. cukrovka, transplantace, rakovina, AIDS)
- » Výskyt onemocnění celosvětový (USA, Čína, Afrika, Kanada, Brazile a z Evropských států např. Francie, Německo, Itálie)
- » Většinu infekcí způsobuje *P. wickerhamii*, ojediněle *P. zopfii* genotyp 2 (*P. bovis*)
- » Přenos – nejčastěji kontakt s kontaminovanou vodou, vstupní branou je pak poraněná tkáň nebo místo po chirurgickém zásahu
- » Není vyloučen přenos nepasterovaným mlékem

Infekce lidí

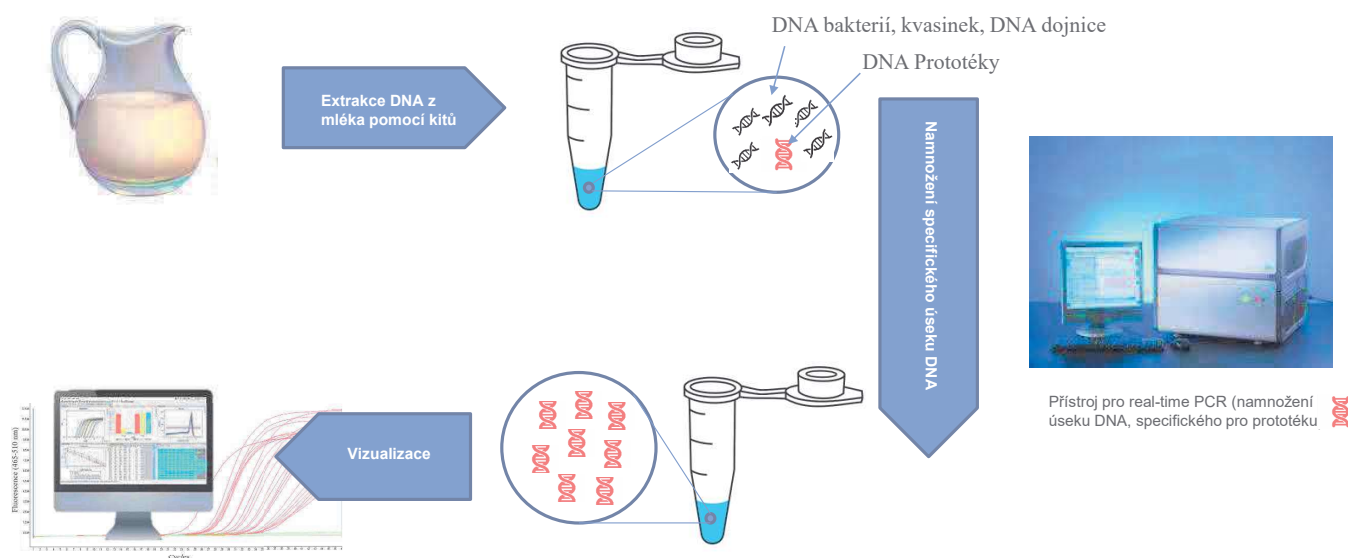
- » Existují 3 hlavní formy prototékové infekce lidí
 - » kožní forma – více než 1/2 případů – postihuje kůži a měkké tkáně
 - » Olecranon bursitis (zánět lokte)
 - » systémová = diseminovaná infekce
- » Onemocnění vzniká pomalu, je potřeba léčba antimykotiky nebo lokální léze lze odstranit chirurgicky



Detekce prototék pomocí molekulárních metod

- » Real-time PCR metoda (qPCR)
 - » umělé **namnožení specifického úseku DNA a jeho vizualizace**
 - » možnost **kvantifikace** = množství prototék v dané matrici (např. mléce)
 - » umožní detekovat prototéku i ve vysoce kontaminovaném vzorku, kde selhávají kultivační metody z důvodu nízké selekce půd
 - » **rychlé a citlivé metody**
 - » přesná identifikace, u multiplexních metod umožní detekovat a identifikovat **více mikrobiálních druhů najednou**

Schéma detekce prototéky v mléce



Monitoring prototéky pomocí qPCR a kultivace v mléce z komerční sítě - výsledky

- » Analyzováno 16 vzorků čerstvého nebo trvanlivého mléka z tržní sítě pocházející z 11 mlékáren
- » Metoda qPCR odhalila přítomnost *P. bovis* ve 13 vzorcích
- » Množství prototék se pohybovalo v koncentracích od několik jednotek až po 10 000 buněk na mililitr mléka
- » Kultivačně se v žádném vzorku prototéku prokázat nepodařilo



Monitoring prototéky pomocí qPCR a kultivace v mléce z komerční sítě - závěr

- » Ve většině testovaných krabicových mlék 81 % z 9 různých mlékáren zakoupených v tržní síti v ČR, byla zjištěna přítomnost *P. bovis*
- » Lze předpokládat, že téměř každá sledovaná mlékárna (9/11) vykupuje mléko kontaminované prototékou alespoň z jedné či více farem
- » V daných vzorcích kultivačně prototéky nebyly prokázány. Takové mléko je tedy z hlediska prototék zdravotně nezávadné, ale může vykazovat zhoršené technologické či nutriční vlastnosti

Děkuji za pozornost



Kontakt: moravkova@vri.cz; 732 870 011

Účinek dezinfekčních prostředků na biofilm kmenů *Candida albicans* a *Prototheca* spp. izolovaných z bazénového kravského mléka

***doc. RNDr. Marcela Klimešová, Ph.D.
Ludmila Nejeschlebová***

Výzkumný ústav mlékárenský Praha

Workshop, Česká Rybná, 21. 10. 2020

MZe NAZV QK1910092 (2019-2023)

Nebakteriální původci mastitid a jejich vliv na kvalitu a technologické vlastnosti mléka

- Výzkumný ústav mlékárenský, s.r.o.,
Praha
- Výzkumný ústav veterinárního
lékařství, v.v.i., Brno
- Státní veterinární ústav, Jihlava
- Madeta, a.s.

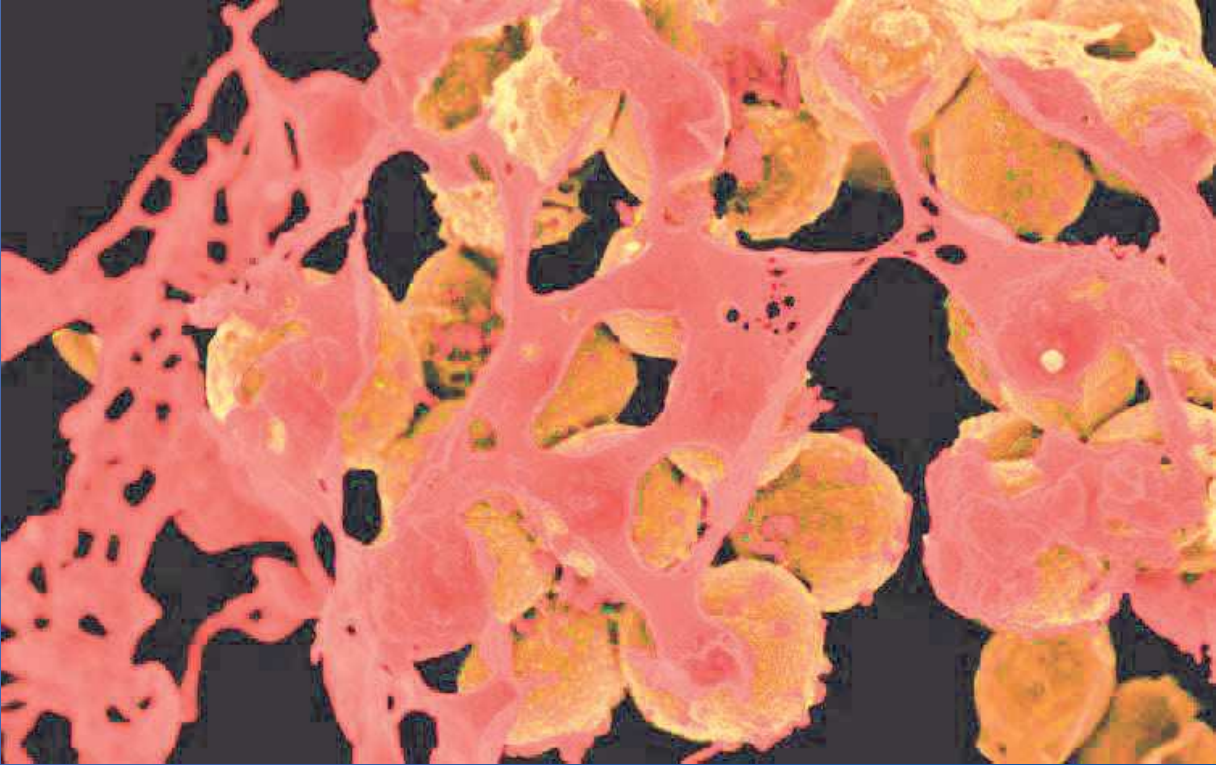
Biofilm

- Biofilmy jsou společenství mikroorganismů stejného nebo různého druhu, které se vyskytují v nejrůznějším prostředí.
- Usnadňují mikroorganismům přežití v nepříznivějším období (sucho, nedostatek živin) a chrání se rovněž i před účinkem dezinfekčních prostředků nebo antibiotiky.
- Tento mikroekosystém je zdrojem jak nežádoucích patogenních MO (*S. aureus*, *S. agalactiae*, *C. albicans*, *P. aeruginosa*), tak technologicky problematických (např. tvorba lytických enzymů u *P. fluorescens*).
K nejzávažnějším MO pak patří rezistentní kmeny, které šíří svoji rezistenci prostřednictvím plasmidů a to mezidruhově i mezirodově bez ohledu na to, zda se tyto mechanismy rezistencí vyskytují u patogenních či nepatogenních bakterií

- Klinický význam-vznikají často chronické a těžko léčitelné choroby
- biofilmové infekcí, mezi které řadí CNS, *S. aureus*, zástupce streptokoků, především *S. gallolyticus*, méně často *S. pneumoniae*, enterokoky, G- (např. *Escherichia coli*, *P. aeruginosa*), *M. tuberculosis* a anaerobních bakterie (např. *Clostridium* spp., *Bacteroides fragilis*, *Peptostreptococcus* spp. a *Actinomyces* spp.).

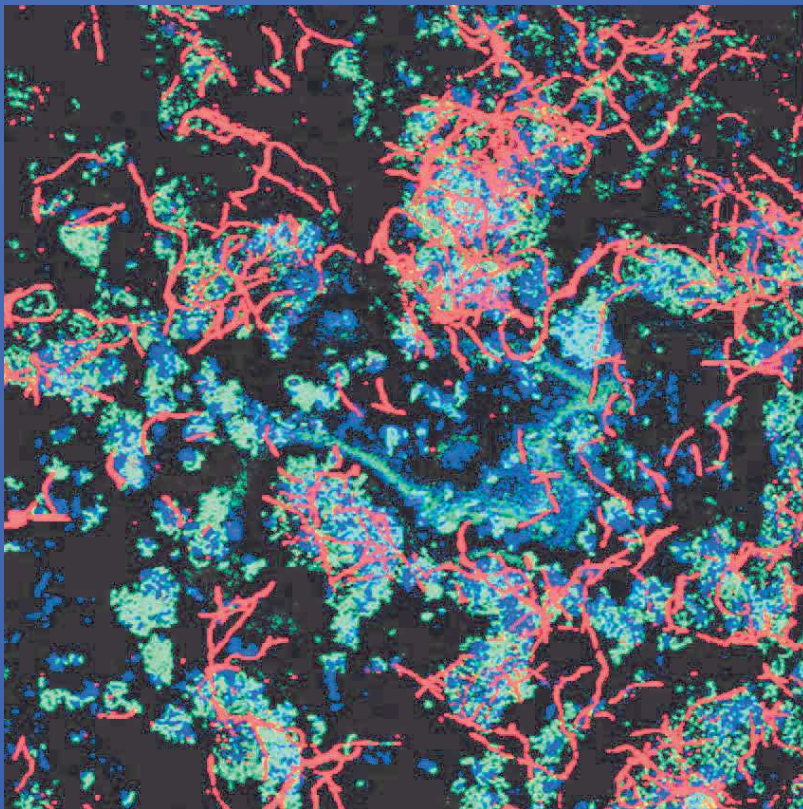
- V prostředí prvovýroby mléka jsou vážným zdravotním problémem mastitidní patogeny s produkcí biofilmů: *S. aureus* a dále environmentální mikroorganismy (*E. coli*, *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp.), CNS, streptokoky (*S. uberis*, *S. dysgalactiae*) a enterokoky (*E. faecalis*, *E. faecium*), stejně jako nebakteriální mikroorganismy, jako *Candida* spp. a *Prototheca* spp.

***S. aureus* MRSA**



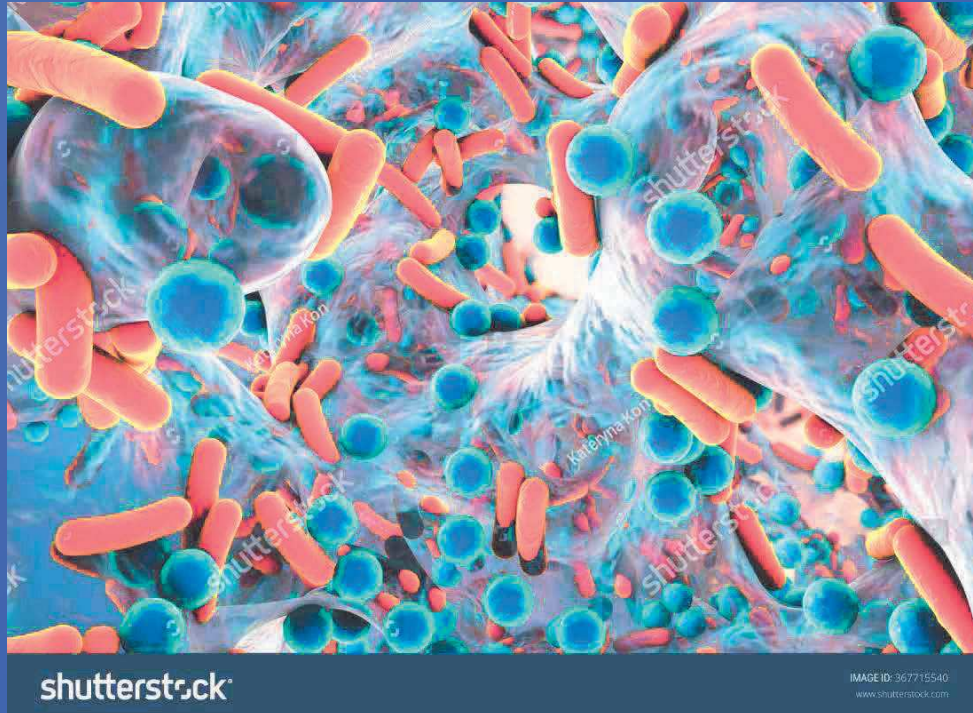
NIAID, NIH; <https://sciencebusiness.technewslit.com/?p=37613>

Multispecies biofilm



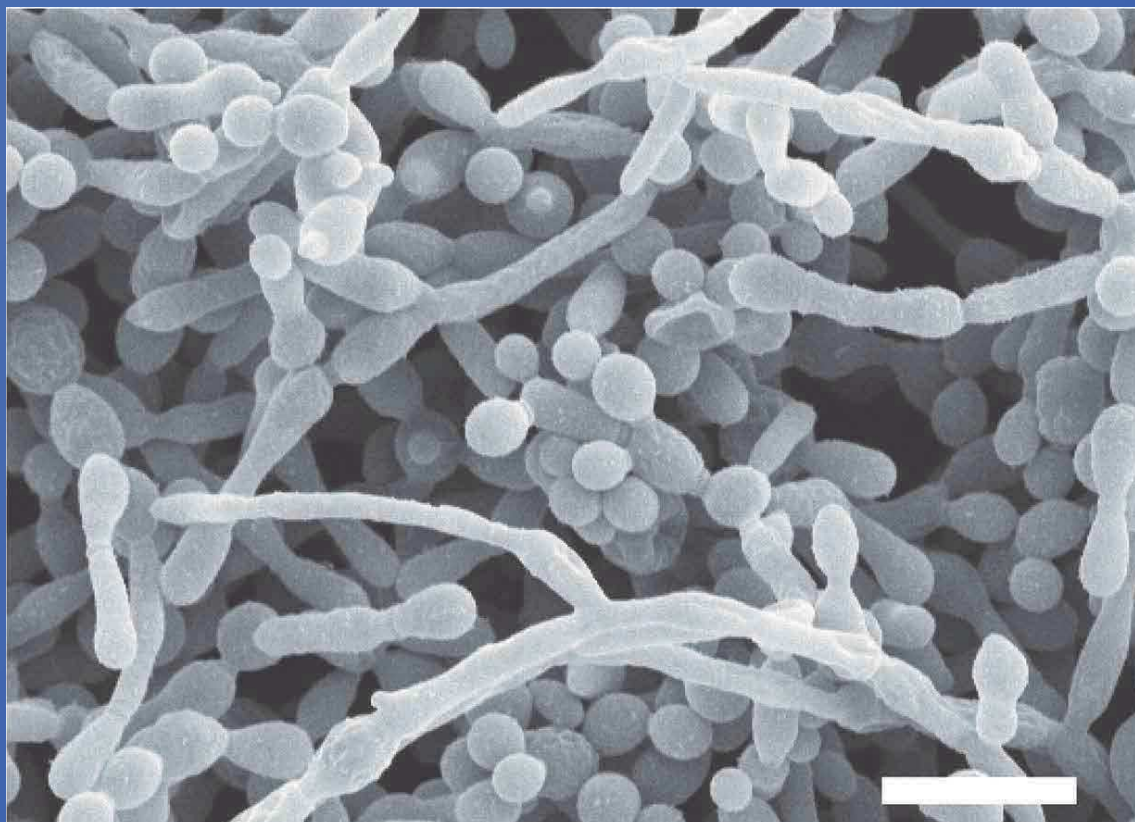
Parsek M.R., Hausler S., 2010, DOI: 10.1128/JB.00332-10

E. coli, P. aeruginosa, M. tuberculosis, Klebsiella, MRSA



Kon K. <https://www.shutterstock.com/cs/image-illustration/biofilm-antibiotic-resistant-bacteria-closeup-view-367715540>

C. albicans



Ramage G., 2005. doi:10.1128/EC.4.4.633–638.2005

Kvasinky

- *Candida albicans* je typickým druhem střevní a ústní mikroflóry. Za normálních okolností u 80 % populace neškodí. Když se však nadměrně přemnoží, způsobuje kandidózu. Kandidóza je často diagnostikována osobám se sníženou imunitou. *C. albicans* se však může přemnožit i v krvi a v genitálním traktu.

Řasy

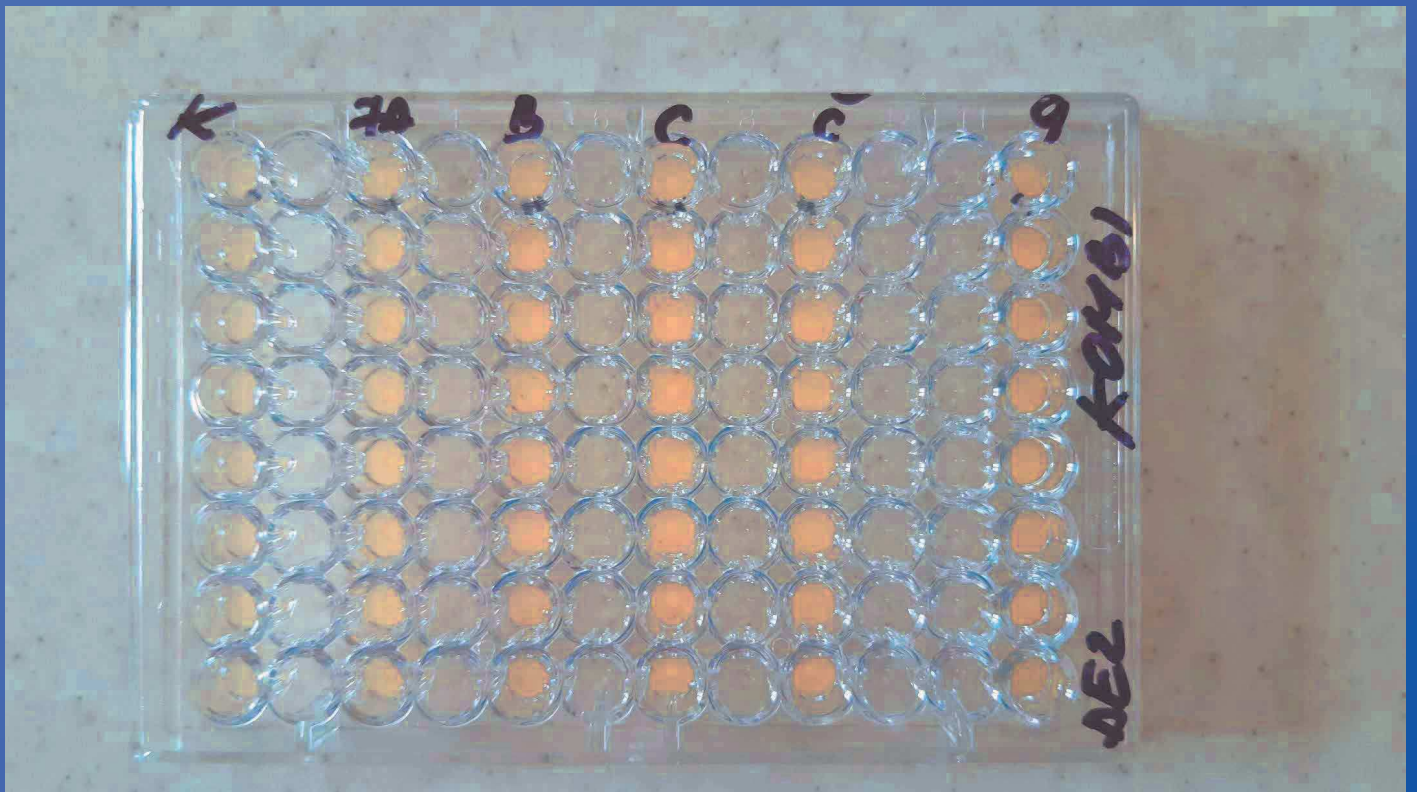
- Jako *Prototheca* jsou označovány druhy patřící do rodu zelených řas z čeledi Chlorellaceae. Bývají izolovány z různých vzorků, hlavně z vlhkého prostředí (hnůj, půda, voda) a někteří zástupci způsobují vzácné infekce u lidí (prototekóza), ale i u zvířat (prototéková mastitida).

- *P. zopfii* genotyp 2 je označován za hlavního původce nebakteriální bovinní mastitidy. Vedle tohoto druhu byla, i když v menší míře, z mastitidního mléka izolována i *P. blaschkae* a *P. wickerhamii*

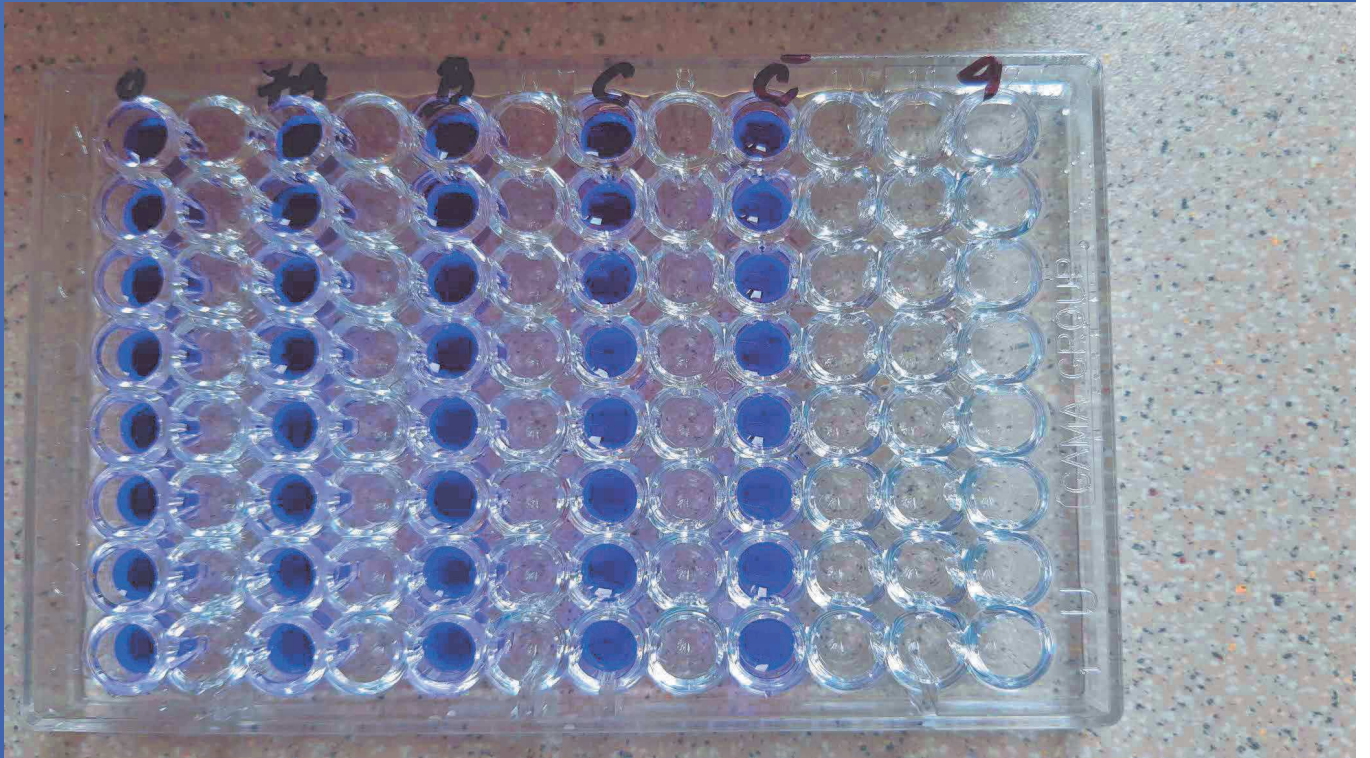
Metodika

- 1 očkovací klička do 9 ml BHI bujonu → pomnožení 24 h/25 °C
- 0,3 ml do 10 ml sterilního BHI bujónu → 100 µl do mikr. destičky (3 dny/25 °C)
- vylití BHI bujonu → 5 x promytí destilovanou vodou → 150 µl 0,1% kryst. violeti po dobu 45 min
- 5 x promytí DV → hodnocení 0, (+), +, ++, +++ (stupnice 0-12)

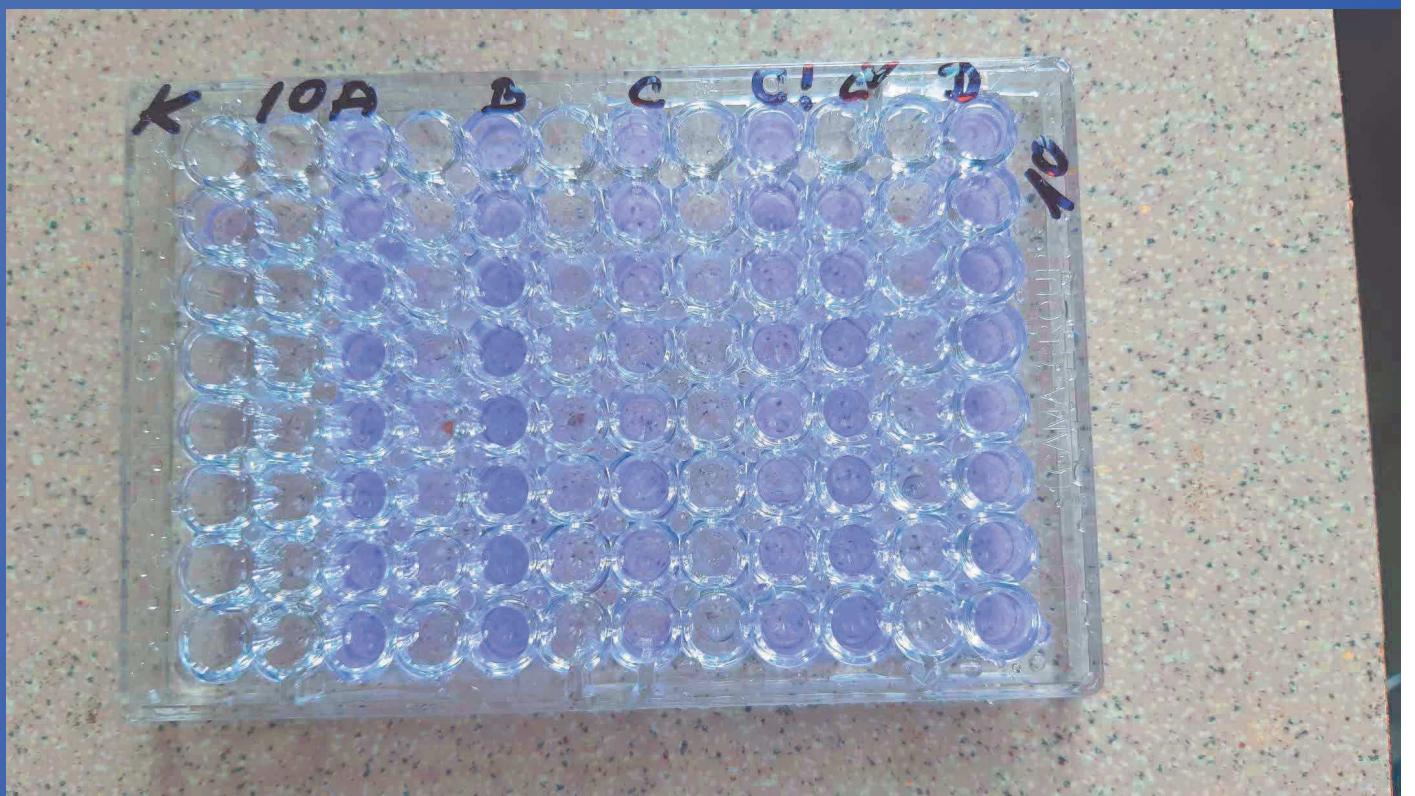
- Djordevic, D., Wiedmann, M., Mc Landsborough, L.A.: Microtiter plate assai for assessment of *Listeria monocytogenes* iofilm formation. Appl. Environ. Microbiol. 68, 2002, 2950 - 2958.



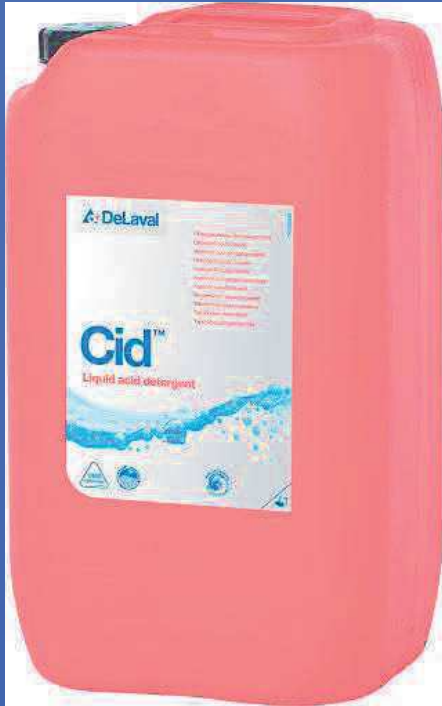
Barvení biofilmů



Odečet biofilmu



Cid™ Liquid acid detergent (DeLaval)



Používaná koncentrace 0,7%

60-80 °C/10 minut

Super Liquid alkaline detergent (DeLaval)



Používaná koncentrace 0,7%

60-80 °C/10 minut

Výsledky biofilmů a citlivosti

<i>C.albicans</i>	BIOFILM	CID K	CID K	SUPER A	SUPER A
Ředění		7%	0,7%	7%	0,7%
1-32 M2	4	2	2	2	2
		50%	50%	50%	50%
2-6-M1	4	2	3	1	2
		50%	75	25	50
2-29-M4	8	5	4,5	3	4
		37,5%	43,8%	62,5%	50%
průměr		45,8%	39,6%	62,3%	49,1%

<i>P. zopfi</i>	BIOFILM	CID K	CID K	SUPER A	SUPER A
ředění		7%	0,7%	7%	0,7%
č.3	2	1	2	1	2
		50%	0%	50%	0%
2-7 M2	2	1	2	2	3
		50%	0%	50%	0%
3-11 M	8	7	8	8	8
		12,5%	0%	0%	0%
3-20 M5	12	10	12	8	10
		16,7%	0%	33,3%	16,7%
3-21 M5	2	2	2	1	1
		0%	0%	50%	50%
průměr		25,8%	0%	36,7%	13,3%

<i>P.blasch.</i>	BIOFILM	CID K	CID K	SUPER A	SUPER A
ředění		7%	0,7%	7%	0,7%
3-10-M3	8	6	8	6	7
		25%	0%	25%	12,5%

Kombinovaný účinek K +A

	CID (K) a SUPER (A)					
	6 hod	6 hod	24 hod	24 hod	24 hod	24 hod
	0,7%	0,7%	0,7%	0,7%	7%	7%
	K+A	A+K	K+A	A+K	K+A	A+K
<i>C. albicans</i>	52,83	49,06	47,17	47,17	47,17	39,62
<i>P. zopfii</i>	40,38	28,85	26,92	11,54	30,77	23,08
<i>P. blaschkeae</i>	37,50	50,00	37,50	50,00	50,00	50,00

Výsledky účinnosti

- roztok 0,7% - vyšší účinnost na kvasinky - 39,6% K a 49,1% A než řasy - 0 K a 13,3% A
- vyšší účinnost koncentrovanějších roztoků (bez statistické významnosti)
- vyšší účinnost při kratší době mezi použitými K a A

Děkuji za pozornost

- **Dotazy na:**
- **Marcela Klimešová**
- **+420 608 260 395**
- **marcela.vyletelova@seznam.cz**



Workshop k výsledkům projektu: Česká Rybná, 21. 10. 2020

Možný vliv subklinických mastitid zapříčiněných řasou *Prototheca* na složení a kvalitu mléka

Průběžné výsledky řešení projektu QK1910092 (Nebakmas).

Součást aktivit České akademie zemědělských věd OŽV

Hanuš O.- Seydlová, R.- Kopecký J.- Roubal, P.- Jedelská R.-
Nejeschlebová L.- Klimešová, M.: VÚM Praha

Sledování, terénní experiment:

Vzorky (dojnice) z KU stáda CF 90 % a H 10 % z listopadu 2019 byly rozděleny dle mykologického vyšetření (VEDIA) dojnic pozitivních na řasu na skupiny *Prototheca* (pozitivní nález, P+, n = 57) a bez *Prototheca* (negativní nález, P-, n = 215)

Výsledky, kontrola užítkovosti, individuální vzorky mléka:

Ukazatel laktace a mléka, KU	P+	P-	Poznámka
Všechny dojnice, n	57	215	
Průměr laktace	3,25	2,31	infikována déle využívaná zvířata
Dny laktace	145	155	malý rozdíl, infekce v max. laktaci
Dojivost, l	23,5	25,3	významné ztráty
Obsah tuku, %	4,06	4,17	menší rozdíl
Obsah bílkovin, %	3,97	3,87	mastitis může mít více bílkovin syrovátky
Obsah laktózy, %	4,75	4,82	kopíruje mastitis a poškození tkání
Obsah suš. tukuprosté, %	9,31	9,29	malý rozdíl
Počet somatických buněk, 10^3ml^{-1}	525	100	velký rozdíl xg a x
	840	270	

Výsledky, kontrola užítkovosti, individuální vzorky mléka:

Ukazatel laktace a mléka, KU	P+	P-	Poznámka
Všechny dojnice, n	57	215	
Močovina, mg/100ml	34,6	31,2	malý rozdíl
T/L	0,86	0,87	malý rozdíl
T/B	1,12	1,09	malý rozdíl
Aceton, mmol/l	0,03	0,03	bez rozdílu
BHB, mmol/l	0,02	0,02	bez rozdílu
Volné mastné kyseliny, mmol/100g	1,42	1,46	malý rozdíl

Výsledky, kontrola užítkovosti, individuální vzorky mléka:

Ukazatel laktace a mléka, KU	P+	P-	Poznámka
Prvotelky, n	4	94	
Dny laktace	196	162	málo P+
Dojivost, l	18,7	23,3	málo P+, velký rozdíl
Obsah tuku, %	4,81	4,27	málo P+
Obsah bílkovin, %	4,29	3,93	málo P+
Obsah laktózy, %	4,75	4,92	málo P+, velký rozdíl
Obsah suš. tukuprosté, %	9,66	9,47	málo P+
Počet somatických buněk, 10 ³ ml ⁻¹	513	89	málo P+, velký rozdíl xg a x
	795	116	

Výsledky, terénní experiment, bazénové vzorky mléka:

Ukazatel mléka, experiment	P+	P-	Poznámka
Bazénový vzorek, listopad, n	6	6	
Patogeny kontagiózní	-	-	<i>Str. agalactiae</i> a <i>Staph. aureus</i>
Patogeny prostřed'ové	3 příp.	-	<i>Str. uberis</i>
Rezidua inhibičních látek	-	-	v P+ 4 případy podezřelé
Celk. poč. mikroorg., CFU/ml	55 119	1 886	velký rozdíl xg a x
	248 667	2 333	
Počet řas a kvasinek	10 039	60	<i>Prototheca</i> a <i>Candida</i> , xg a x
	11 050	596	
Počet somatických buněk, 10 ³ ml ⁻¹	777	114	velký rozdíl xg a x
	814	127	

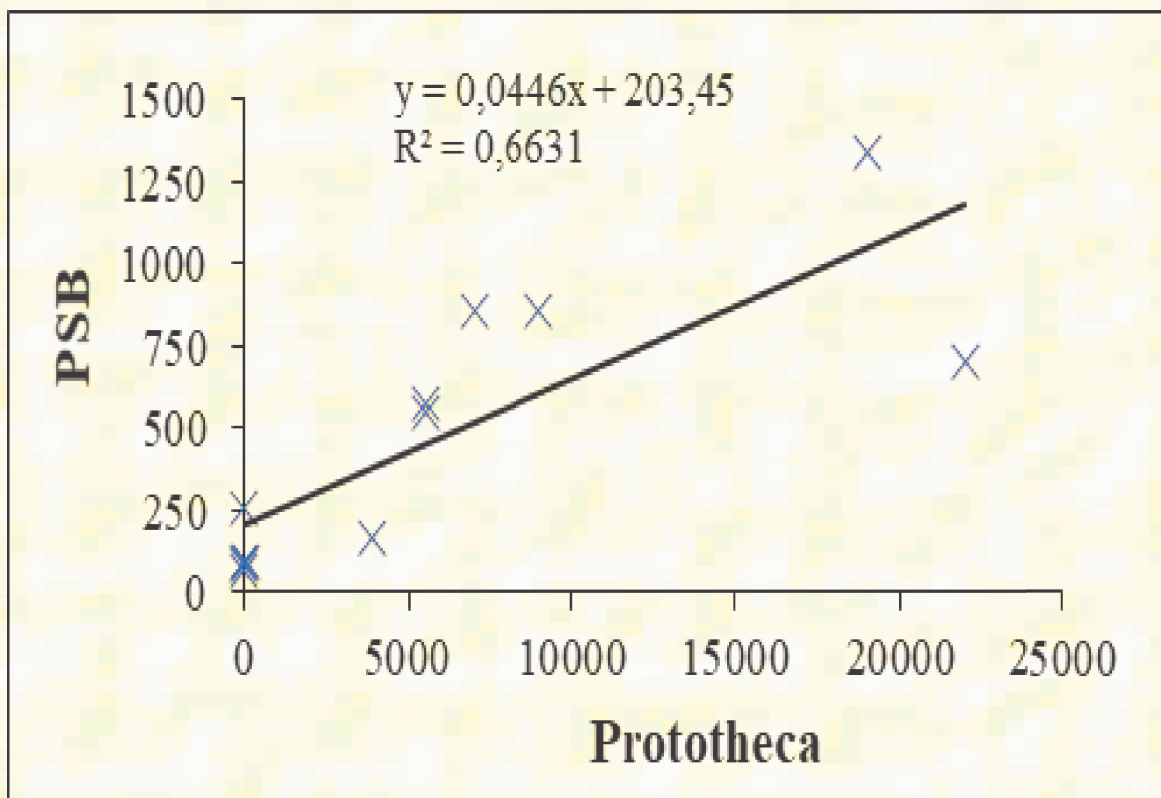
Výsledky, terénní experiment, bazénové vzorky mléka:

Ukazatel mléka, experiment	P+	P-	Poznámka
Bazénový vzorek, listopad, n	6	6	
Obsah tuku, %	3,47	4,06	nevýzn., ve smyslu patogeneze mast.
Obsah bílkovin, %	3,96	4,06	nevýznamné
Obsah kaseinu, %	3,18	3,24	ve smyslu patogeneze mastitid
Obsah laktózy, %	4,75	4,87	nevýzn., ve smyslu patogeneze mast.
Obsah suš. tukuprosté, %	9,32	9,53	význ., ve smyslu patogeneze mast.

Výsledky, terénní experiment, bazénové vzorky mléka:

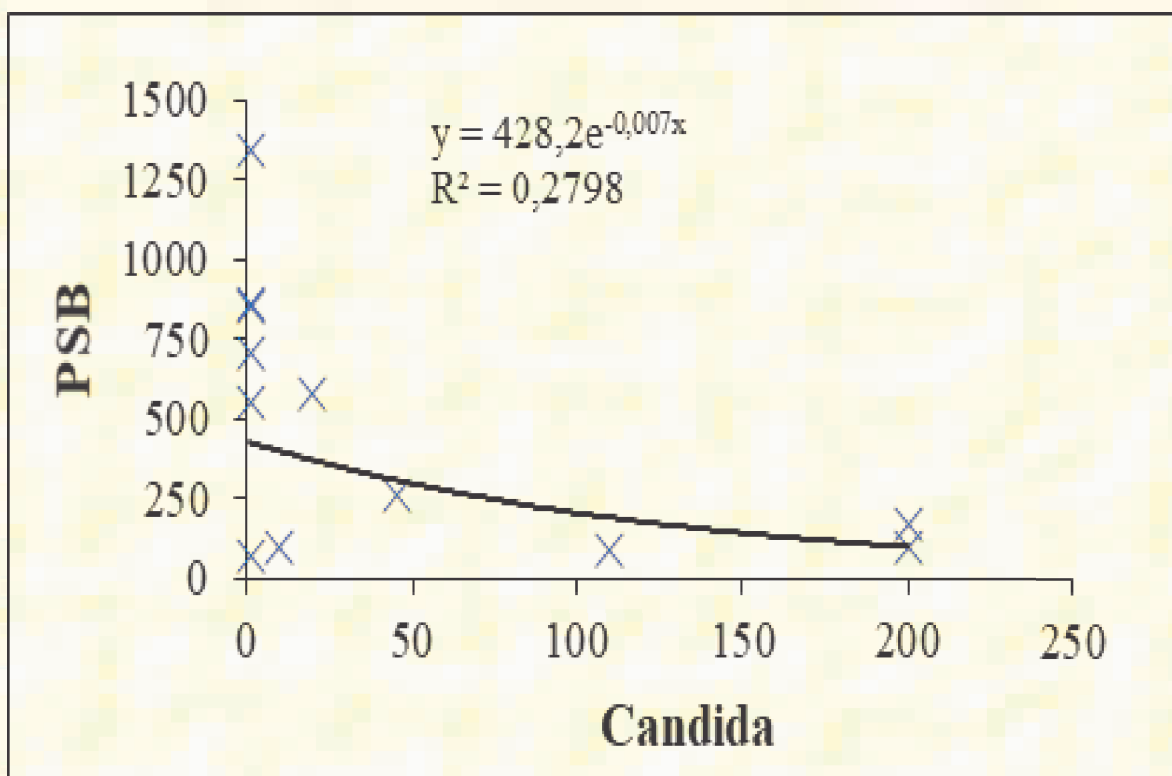
Ukazatel mléka, experiment	P+	P-	Poznámka
Bazénový vzorek, listopad, n	6	6	
Bod mrznutí mléka, °C	-0,536	-0,53	ve smyslu patogeneze mastitid
Elektrická konduktivita, mS.cm ⁻¹	4,31	3,98	ve smyslu patogeneze mastitid
Aktivní kyselost mléka, pH	6,64	6,61	pufrační kapacita
Volné mastné kyseliny, mmol/100g	0,61	1,985	překvapivé, očekáván opak
Alkoholová stabilita, ml	5,05	6,2	P+ významně horší
Titrační kyselost, °SH	7,14	7,9	mast. alkal., méně bílk. a kas. pro P+
Syřitelnost, sekunda	55,3	60,7	koagulace bílkov. syřidlem, překvap.
Kysací schopnost, °SH	23,3	25,1	P+ zhoršení

Vztah frekvence *Prototheca* k počtu somatických buněk v bazénovém mléce.



Lineární: $y = 0,0446x + 203,45$; $n = 12$; $R^2 = 0,6631$; $r = 0,814^{**}$

Vztah frekvence *Candida* k počtu somatických buněk v bazénovém mléce.



Exponenciální: $y = 428,2e^{-0,007x}$; $n = 12$; $R^2 = 0,2798$; $r = 0,529^{ns}$

Závěr:

- infekce *Prototheca* je častější u starších krav kolem 3. laktace a je záležitostí spíše hned počátku laktace, kdy jak známo je zvýšena vnímavost vůči mastitidám obecně;
- infekce *Prototheca*, pravděpodobně v kombinaci i s jinými patogeny (*Str. uberis*), snižuje výrazněji užitkovost dojnic, cca 7 % a možná více;
- infekce *Prototheca*, pravděpodobně v kombinaci i s jinými patogeny (*Str. uberis*), zvyšuje výrazněji PSB, stejně jako elektrickou vodivost, při zlepšení bodu mrznutí mléka;

Závěr:

- z technologických vlastností je u *Prototheca* zhoršena alkoholová stabilita a je také alkalizováno mléko (nižší titrační kyselost);
- další mírné zhoršení technologických vlastností u *Prototheca* lze zachytit u kysací schopnosti mléka;
- z uvedených výsledků bohužel nelze odvodit nějaká přesnější vodítka či náznaky pro možnou konkrétní lokalizaci zdroje této prostřed'ové nákazy;

Závěr:

- vlivy přítomnosti řasy *Prototheca* na složení a technologické vlastnosti mléka byly pozorovány nižší než v práci Seydlová et al., 2009, VLIV OBSAHU PROTOTHECA ZOPFII A CANDIDA LUSITANIAE NA KVALITU SYROVÉHO MLÉKA, pravděpodobně proto, že četnost výskytu řas byla v reálu zřetelně nižší než použité inokulace média v experimentu.



„Děkuji za pozornost“