

Podíl autorů na tvorbě metodiky:

Ing. Růžena Seydlová, Ph.D. – podíl 40%
Ing. Petr Roubal, CSc. – podíl 5%
Prof. Dr. Oto Hanuš – podíl 10%
Doc. RNDr. Marcela Klimešová, Ph.D. – podíl 5%
Mgr. Monika Morávková, Ph.D. – podíl 10%
Mgr. Monika Beinhauerová, Ph.D. – podíl 5%
MVDr. Ivana Kucharovičová – podíl 10%
MVDr. Šimon Friedrich – podíl 5%
Ing. Milan Novosad – podíl 5%
Ing. Veronika Střelečková – podíl 5%

Závazná struktura a obsah metodiky:

	str.
Cíl metodiky	2
Vlastní popis metodiky	3
Srovnání „novosti postupů“ oproti původní metodice, případně jejich zdůvodnění, pokud se bude jednat o novou metodiku (§ 2, odst. 1, písm. b) a písm. c) zákona č. 130/2002 Sb.).	15
Popis uplatnění metodiky – informace pro koho je určena a jakým způsobem bude uplatněna.	15
Ekonomické aspekty – odhad nákladů (v tis. Kč) na zavedení postupů uvedených v metodice a odhad ekonomického přínosu (v tis. Kč) pro uživatele	15
Seznam použité související literatury	16
Seznam publikací, které předcházely metodice a byly publikovány, pokud existují, případně výstupy z určité znalosti, jestliže se jedná o originální práci	18
Jména oponentů, kteří zpracovali posudky, a názvy jejich organizací.	19
Dedikace projektu	19

Cíl metodiky

Cílem projektu bylo zmapování 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.

Cílem této práce jsou metodická doporučení pro opatření ke snižování výskytu vybraných nebakteriálních původců mastitid v prvovýrobě mléka.

Vlastní popis metodiky

Úvod do problematiky

Prototheca spp. je jednobuněčná řasa bez chlorofylu, která se vyskytuje v různorodých přírodních podmínkách, nejvíce jí vyhovuje prostředí s vysokou vlhkostí a podílem organického materiálu. Patří do kategorie oportunistických patogenů jak lidí, tak zvířat, kde přesný mechanismus vývoje prototékové infekce není zcela jasný. Několik *Prototheca* spp., jmenovitě *P. ciferrii*, *P. bovis*, *P. wickerhamii*, *P. blaschkeae*, *P. cutis* a *P. miyajii* jsou původci onemocnění jak u lidské, tak zvířecí populace. Tato skutečnost podtrhuje potřebu dalšího studia pro vytvoření zdravotních principů tohoto nebakteriálního patogenního mikroorganismu. Bovinní mastitidy jsou dominantní formou prototékové infekce. Nicméně infekce se vyskytuje i u psů, koček, koz a z části i u ostatních obratlovců. Všeobecně celosvětově nárůsty prototékových onemocnění jsou na vzestupu a přitahují tak pozornost humánních a veterinárních lékařů.

Prototheca spp. byla historicky identifikovaná Krugrem v roce 1894, který ji zařadil mezi houby podle kultivační podobnosti s kvasinkami. Patogenní potenciál nebyl v tuto dobu známý. První humánní a prototékové infekce zvířat byly popsány až v letech 1952 v Německu. Mastitidy způsobené prototékou jsou rozšířeny po celém světě. Vždy, když se objeví rezistence na antibiotickou léčbu mastitidy, roste podezření, že patogenem je právě řasa. Na začátku 21. století se rozšířily prototékové infekce v humánní populaci v návaznosti na chemoterapii. Zdravotní organizace zjišťují vztahy mezi zdravotním stavem lidí a zvířat ve vazbě na ekosystémy a nutí vytvářet a adresně porozumět s řasou spojené problematice. Řasa je naprosto adaptovaná na vnější prostředí, které vytvořil člověk. Může se tak rozšířit prakticky kamkoli, kde najde vhodný zdroj výživy.

Prototheca bovis a *Prototheca blaschkeae* jsou nejdůležitější původci bovinních mastitid. Množí se sporií, které se liší podle zástupců tvarem, velikostí i počtem. V různých stádiích fyziologického růstu se mění i specifická velikost buněk a síla jejich buněčné stěny. Kultivační teploty a její doba jsou u jednotlivých zástupců rozdílné, a to od 30-35 °C po 72 hodin až 7 dní pro odečet viditelných kolonií na miskách. Kultivační media obsahují glukózu a antibiotikum chloramfenikol k potlačení růstu bakterií. *Prototheca* spp. nesnáší dlouhodobé zamražení, a proto se doporučuje pro kultivační analýzy vycházet z čerstvých vzorků. Typické pro řasu, která se již zapouzdřila do tkáně mléčné žlázy, je intermitentní vylučování do mléka. Tím je velice ztížen její záchyt. Z tohoto důvodu je nutné provádět opakované odběry a kultivace u suspektních dojnic. Ovšem dojnice, která byla jednou zjištěna jako pozitivní, zůstává pozitivní až do doby vyřazení ze stáda bez ohledu na to, jaké budou následné kultivace.

Infekce je tedy vázána primárně na mléčnou žlázu, kde se vytváří granulomatózní tkáň. Vstupní branou infekce je vždy strukový kanálek, v některých případech léze na povrchu kůže struku. Závažnost onemocnění závisí na množství mikroorganismů, které se dostaly do mléčné žlázy a stavu imunitního systému. Predispozičním faktorem vzniku mastitidního onemocnění je imunoprese. Řasa je schopna přežívat v makrofázích, buňkách imunitního systému. *P. bovis* přečkává v mléčné žláze období zaprahlosti a v následné laktaci se může opět objevit v mléce. Je také rozšiřována výkaly do vnějšího prostředí. Telata krmená mlékem od pozitivních dojnic mohou být dalším zdrojem kontaminace prostředí. Může být izolována z mulce, rekta, výkalů nebo vagíny dojnice, aniž produkované mléko je pozitivní. I když odebrané vzorky tkání na jatkách (děloha, ledviny) od primárně pozitivních dojnic s nálezy v mléce byly pozitivní také. Kultivace stěrů z prostředí dojírny jsou většinou pozitivní. Jediná *P. bovis* se rozšiřuje pravděpodobně jen přenosem přes dojící jednotky v procesu dojení.

Definitivní guidelines pro řešení prototékové infekce a její eradikace nebyl zatím nikde a nikým zpracován. Důvodem je vysoká úroveň rezistence k celému spektru antibakteriálních látek a stejně tak nižší korelace mezi klinickou reakcí „*in vivo*“ a „*in vitro*“. Citlivostí *P. spp* se věnovala celá řada vědeckých pracovišť jako je CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) a EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Standardní guidelines nebyly zatím ovšem vytvořeny pro prototékové infekce ani pro lidi ani zvířata. Do současnosti nebyla vynalezena žádná efektivní terapie prototékových mastitid, která by se mohla rutinně aplikovat. Existují některé přípravky, které se aplikují u lidí, ale pro řešení onemocnění na zemědělských farmách jsou moc drahé nebo jejich použití je zakázáno Evropskou unií pro zvířata produkující potraviny (Annex to Regulation/EU/ No 37/2010 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in food stuff of animal origin).

Pozitivní dojnice musejí být vyřazeny ze stáda a zabezpečeny tak, aby nemohly nakazit zdravé jedince, a to při společném ustájení ani dojení. *Prototheca spp.* je nezníčitelná ani průchodem přes zažívací trakt. Příroda její buněčnou stěnu vybavila organickým polymerem rezistentním k mechanickému stresu, účinkům chemických látek, tedy i k působení enzymů. Je schopna persistovat ve vnějším prostředí ve formacích biofilmů, které jsou nenarušitelné jakýmkoli sanitačními prostředky. Citlivost řasy na pasterační teploty vykazuje nejednoznačné výsledky. Jedině ultrapasterací mléka bylo dosaženo 100 % výsledku. Konzumace neošetřeného mléka od pozitivních dojnic na farmě vytváří potenciální riziko pro zdraví člověka. Výskyt environmentálních mastitid vykazuje sezónní charakter s vrcholem v letních měsících a obdobích vysoké vlhkosti prostředí.

V letech 2019 až 2022 bylo celkem odebráno z 21 mlékáren v České republice 1051 bazénových vzorků mléka, vždy v období od konce dubna do června. Základním posláním projektu QK1910092 bylo zmapovat nebakteriální původce mastitid a jejich vliv na kvalitu a technologické vlastnosti mléka. K diagnostice nebakteriálních mastitidních patogenů byly vzorky zaslány do Státního veterinárního ústavu Jihlava a Výzkumného ústavu veterinárního lékařství Brno. Zde byla diagnostika zaměřena na identifikaci a kvantifikaci kvasinek, plísni a řas. Celkem bylo odebráno 1051 bazénových vzorků mléka, z nichž pouze 38 (3,6 %) bylo negativní, neobsahující žádné nebakteriální mastitidní patogeny. Řasa *Prototheca spp.* byla vykultivována v 46 bazénových vzorcích, což představuje záchyt 4,37 %, kde dominantním mastitidním patogenem byla *Prototheca bovis*. Z veterinární praxe a znalosti provozu vyplývá, že prototékové mastitidy postihují jak velká, tak i malá stáda, většinou se jedná o dojnice s vyšší užitkovostí. Kvantifikací byly detekovány rozdílné denzity řasy z bazénových vzorků, kdy maximální dosáhla $6,9 \cdot 10^3 \times \text{ml}^{-1}$. Nálezy diagnostikované z individuálních náběrů ve stádech pak dosahovaly rozmezí od 0,7 do 45 % odebraných vzorků mléka produkčních dojnic.

Proč sledovat výskyt řasy *Prototheca spp.* v bazénových vzorcích mléka, netypického původce mastitid

- negativní vliv na kvalitu mléka
- vliv zvýšeného obsahu řasy na technologické vlastnosti mléka
- zoonóza
- důkaz významně snížené imunity dojnic
- schopnost přežívat v hypnosporách a makrofázích
- schopnost přežívat ve vnitřních orgánech – způsobuje nevratné narušení tkání
- diagnostika v kamenných laboratořích jen na vyžádání
- faremní diagnostika má svá omezení

- intermitentní vylučování do mléka
- nebezpečí předávkování antibiotiky, pokud není kvalitní diagnostika původce
- nebezpečí nálezu reziduí inhibičních látek (RIL) v mléce
- necitlivost k aplikovaným antibiotikům
- omezená citlivost k sanitačním prostředkům
- eradikační proces náročný
- spontánní vyléčení neexistuje

Souběh faktorů pro incidenci řasy *Prototheca* spp. v chovu

- chronicky snížená imunita dojnic
- poporodní stres prvotetek – dlouhodobé stavy ketózy po otelení
- dlouhodobá produkční zátěž dojnic
- mykotoxiny v krmivech
- nedostatečná kvalita ustájení
- nevhodný režim dojení
- nehygienická příprava mléčné žlázy na dojení
- absence dezinfekčních opatření ve stáji
- absence mezidezinfekce dojících jednotek během dojení
- léčení mastitidních dojnic bez stanovení původce a antibiogramu
- eliminace fyziologického osídlení mléčné žlázy
- dlouhodobá neřízená léčba antibiotiky
- nehygienická aplikace antibiotik a sealů do struku
- používání kanyl na zprůchodnění struku
- zkrmování mléka od pozitivních dojnic
- nulová mikrobiologická kontrola dojnic při zařazení do produkce
- společné ustájení pozitivních a zdravých jedinců
- společná pastva pozitivních a zdravých jedinců

Základní charakteristika řasy *Prototheca* spp. způsobující mastitidy skotu

- hlavní zástupci: *Prototheca bovis*, *Prototheca blaschkeae*, *Prototheca ciferrii*
- environmentální patogen se schopností se chovat kontagiózně
 - bez schopnosti fotosyntézy
 - jednobuněčný bez chlorofylu
- tvar kulovitý až oválný
- velikost 15x13 až 9x7 μm
- reprodukce sporangiosporami
- snadno zaměnitelná s kvasinkou při kultivačním vyšetření
- dlouhá doba kultivace (5-7 dní)
- produkuje proteolytické a lipolytické termostabilní enzymy
- schopnost utilizace dusíku z aplikovaných ATB
- vytváří biofilmy
- využívá laktózu

- přežívá ve formě spor
- nereaguje na sanitální prostředky, jód a kyselina peroctová vykazují baktericidní účinnost
- řasa je často doprovázena kvasinkami
- způsobuje mastitidy u skotu klinické (akutní a chronické), subklinické a latentní
- klinické projevy závisí na koncentraci řasy
- klinické mastitidy významně navyšují počet somatických buněk v mléce
- typické znaky klinické mastitidy a navíc balónovité otoky vemen
- klinické mastitidy narušují látkovou skladbu mléka
- klinické mastitidy narušují reprodukční schopnosti dojnic
- akutní stavy mastitidy mohou končit letálně

Základní charakteristika prototéka pozitivní dojnice

- vysoká užitkovost
- prvotelky, dojnice na 2. a dalších laktacích
- možnost infekce v průběhu celé laktace
- snížené imunitní reakce
- dojnice ve stavu imunosuprese
- metabolická dysbalance
- nedostatek stopových minerálních látek
- krmná dávka obsahuje nadlimitní množství mykotoxinů
- off label aplikace antibiotik
- neaseptická aplikace antibiotik v laktaci a při zaprahování, neaseptická aplikace sealů při zaprahování

Základní charakteristika ustájení

- základ loží je čerstvý hnůj dostýlaný slámou
- nepravidelné vyhrnování hnoje ve stáji
- hluboká podestýlka pro zasušené a otelené dojnice
- vysoká vlhkost prostředí
- společné ustájení zasušených a otelených dojnic
- společné ustájení březích pozitivních dojnic a zdravých
- sekce stlaná neošetřeným separátem pro zasušené a otelené dojnice
- absence účinných dezinfekčních ošetření

Zdroje infekce

- krmivo
- stelivo
- výkaly dojnic
- výkaly telat krmených mlékem od pozitivních dojnic
- vodní zdroje

- společná pastva pozitivních a ostatních zdravých dojnic
- jednotlivé pozitivní dojnice
- zbytky mléka ve strukových návlečkách po podojení pozitivní dojnice
- dezinfektor nevyhrazený jen pro nemocné dojnice
- ruce obsluhy, i když pracuje v rukavicích

Cesty nákazy

- přes strukový kanálek
- lézí (poraněním) na kůži struku
- zkrmováním mastitidního mléka od pozitivních dojnic telatům
- výkaly telat krmených mlezivem/mlékem od pozitivních dojnic
- krevní cestou od pozitivní matky na tele

Základní opatření k omezení šíření

- podpora imunity dojnic
- zkvalitnění krmné dávky včetně minimalizace obsahu mykotoxinů
- plošná dezinfekce stáje a dojírnny
- radikální obnova podestýlky
- mykologické vyšetření celého stáda
- odběr mikrobiologických stěrů z prostředí stáje
- odběr napájecí vody na mikrobiologický rozbor
- odběr komponentů krmné dávky na mikrobiologický rozbor
- odběr materiálu na stlaní na mikrobiologický rozbor
- označení všech pozitivních dojnic na IK
- separace pozitivních dojnic do extra sekce
- dojení zdravých dojnic jako prvních
- dojení pozitivních dojnic v extra dojírně nebo jako poslední
- extra dezinfektor pro zdravé a pozitivní dojnice (účinná látka jód)
- vyřazení pozitivních dojnic
- mezidezinfekce dojcích jednotek po každém použití (účinná látka kys. peroctová)
- optimální příprava mléčné žlázy na dojení
- dojnice po otelení zařazovat do produkce až po negativním mykologickým vyšetření

Možnosti léčení

- neexistují, jen preventivní organizační opatření

Základní body eradikace řasy

- plošné mykologické vyšetření všech dojnic
- zápis výsledku vyšetření do inseminační karty
- separace pozitivních dojnic do extra stáje
- vyřazení pozitivních jalových dojnic na jatka
- dojení pozitivních dojnic na konec procesu při dodržování přísných hygienických požadavků
- práce obsluhy dojírnny v opakovaně dezinfikovaných rukavicích

- zavedení mezidezinfekce všech dojících jednotek po každém použití
- zákaz zkrmování mléka od pozitivních dojnic
- zákaz prodeje syrového mléka od pozitivních dojnic

Je celosvětově potvrzeno, že prototékové infekce vykazují významný nárůst u skotu za poslední období. *Prototheca* spp. se stává závažným mastitidním patogenem v různých zemích a regionech. Její schopnost přežití ve vnějším prostředí a rozšíření se do stád dojnic znamená obrovský problém pro farmáře. Vzhledem k tomu, že neexistuje samozhojení a ani nejsou k dispozici antibiotika, která by byla účinná, tak nejúčinnější zbraní proti ní je prevence. Vzhledem k tomu že se jedná o patogen, který má vysokou afinitu i k humánní populaci, je nutné této problematice se zevrubně věnovat a pokusit se vytvořit alternativní řešení, které by bylo schopno mít prototékové infekce pod kontrolou.

Identifikace nebakteriálních původců mastitid

Vzorky mléka (individuální či bazénové) o objemu alespoň 10 ml je nutno odebrat do sterilní vzorkovnice a po odběru transportovat do laboratoře v chlazeném stavu. Pokud byla ve stádě prokázána prototéková mastitida, pro detekci časných a subklinických infekcí má zásadní význam okamžité vyšetření mléka všech krav ve stádě (Milanov et al., 2016). V ideálním případě by měly být vyšetřeny vzorky mléka z jednotlivých čtvrtí, aby se předešlo vzniku falešně negativních výsledků. Pokud je infikována pouze jedna čtvrť, ředěním mlékem ze zdravých, neinfikovaných čtvrtí by se mohl snížit počet patogenů ve složeném vzorku mléka pod limit detekce. Přestože se v případě prototékózy jedná o perzistentní infekci, není vždy možné odhalit všechny infikované jedince ve stádě během jediného testování laktujících krav z důvodu přerušovaného vylučování agens v mléce. Z toho důvodu se doporučuje pravidelné opakované vyšetření podezřelých krav ve stádě.

Odběr vzorku

Metodika odběru vzorku pro diagnostiku nebakteriálních původců mastitid v principu odpovídá obecným zásadám odběru mléka pro bakteriologické vyšetření.

Před vlastním odběrem provedeme:

- 1.) Posouzení zdravotního stavu dojnice resp. mléčné žlázy
- 2.) Posouzení sekretu mléčné žlázy

Ad 2.) Provedeme NK-test, hodnotíme + až ++++ (resp. 1-4). Provedeme smyslové posouzení sekretu mléčné žlázy. Výsledek obou výše uvedených posouzení zaznamenáme do žádanky k mikrobiologickému vyšetření

Typ vzorku:

Čtvrťový

Půlový

Směsný

Pro diagnostiku mastitid dáváme přednost vzorkům čtvrťovým nebo půlovým.

Vlastní odběr mléka pro mikrobiologické vyšetření:

- odběr má probíhat bezprostředně před dojením nebo min. 2 hodiny po dojení, v případě kvasinkových mastitid se doporučuje odběr na konci dojení

- při odběru na dojrně necháme provést standardní přípravu vemene před dojením včetně oddojení prvních stříků a vzorku ze všech čtvrtí na paletu pro provedení NK-testu
- ústí strukových kanálků očistíme krouživým pohybem pomocí alkoholového desinfekčního ubrousku.
- oddojíme vzorek mléka z jednotlivých čtvrtí- u půlových nebo směsných vzorků dbáme na oddojení stejného množství mléka z jednotlivých struků. Zkumavky plníme vždy do max. ½ až ¾ výšky. Zkumavky ukládáme do stojánku.
- po odběru vzorky ihned chladíme.

Historický přehled diagnostiky nebakteriálních původců mastitid

Infekce vyvolané nebakteriálními původci mastitid mohou být diagnostikovány histopatologickým vyšetřením a/nebo izolací daného patogenního agens, převážně z mléka. Historicky identifikace *Prototheca* spp. a kvasinek spočívala na stanovení fenotypových znaků zahrnujících morfologii kolonií na kultivačních půdách, mikromorfologii kultury a biochemické profilování (Jagielski et al., 2018). Za účelem stanovení přítomnosti kvasinek ve vzorcích mléka se nejčastěji využívá kultivace. Pro kultivační vyšetření se rutinně používá Sabouraud-dextrózový agar s chloramfenikolem. Na kultivaci navazuje mikroskopická, případně biochemická identifikace izolátů. V posledních letech se značně využívají i chromogenní půdy nebo druhová identifikace pomocí metody hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF.

Standardní metoda detekce *Prototheca* spp. je časově náročná. Kultivují se podobně jako kvasinky na rutinních kultivačních médiích (Sabouraud-dextrózovém agarovém médiu, krevním agaru), kde po 24–72 hodinách vytvářejí krémově bílé až šedé kolonie o průměru 1–3 mm (Milanov et al., 2016). Vzhledem k podobné morfologii kolonií na těchto půdách jsou snadno *Prototheca* spp. zaměnitelné s kvasinkami a navíc je mohou přerůst rychleji rostoucí bakterie, čímž dochází k oddálení identifikace tohoto infekčního agens. Selektivní médium pro *Prototheca* spp. obsahuje kombinaci fluorocytosinu a hydrogenftalátu draselného, která znemožňuje růst bakterií a kvasinek. Většinu druhů *Prototheca* lze kultivovat při 30 °C po dobu 72 hodin a kmeny způsobující mastitidu taktéž při teplotě přibližně 35 °C. Některé kmeny však preferují teplotu 25 °C a pomalu rostoucí izoláty mohou vyžadovat až 7 dní pro vytvoření viditelných kolonií (Libisch et al., 2022). Získané izoláty lze následně identifikovat pomocí biochemické analýzy a mikroskopie, při které se preparáty barví dle Grama či pomocí Laktofenolové modře. Pro řasu *Prototheca* je charakteristická asexuální reprodukce prostřednictvím tvorby endospor. Počet tvořených endospor (2–20), jejich tvar a velikost se u druhů *Prototheca* liší. Zralé formy sporangií (mateřských buněk) *P. wickerhamii* dosahují menší velikosti (3–10 μm) než sporangia *P. bovis*, která se formují do kulovitěho (15×13 μm) až oválněho tvaru (9×7 μm). *P. wickerhamii* má tendenci tvořit symetrická sporangia připomínající morulu (endospory uspořádané symetricky jako sedmikráska), zatímco *P. bovis* vykazuje spíše náhodné vnitřní segmentace.

Identifikace *Prototheca* spp. na základě fenotypových znaků, ačkoli stále využívaná, je čím dál častěji nahrazována přesnějšími a rychlejšími molekulárními metodami či proteomickou analýzou pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. Nejčastěji používanými molekulárními metodami jsou polymerázová řetězová reakce (PCR) a sekvenování DNA v rámci ribozomálního operonu. Pro přímou detekci prototék

prostřednictvím specifické PCR bylo navrženo několik molekulárních markerů lokalizovaných na ribozomální DNA, nicméně vyšší diskriminační schopnost následně prokázala PCR zacílená na mitochondriální gen *cytb* (kódující cytochrom *b*) a kombinovaná s RFLP (polymorfismus délky restrikčních fragmentů) analýzou, která umožnila rozlišit všechny dosud známé druhy *Prototheca* spp. Kromě zmíněných diagnostických metod lze k rozlišení infikovaných a neinfikovaných dojnic ve stádě použít sérologickou metodu ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), která umožňuje detekovat protilátky vůči prototéce v séru a syrovátce (Libisch et al., 2022).

Všechny zmíněné konvenční metody jsou často limitovány svou citlivostí, přesností, časovou náročností a v neposlední řadě cenou. Z toho důvodu byly na pracovišti Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v.v.i. vyvinuty a zavedeny dvě nové molekulárně-biologické diagnostické metody, multiplexní kvantitativní PCR (qPCR) a MOL-PCR (multiplexní oligonukleotidová ligace – polymerázová řetězová reakce), které tyto nedostatky překonávají a umožňují přesnou a citlivou detekci, kvantifikaci a identifikaci nejčastěji se vyskytujících druhů prototék, respektive kvasinek ve vzorcích mléka či klinických vzorcích.

Současné možnosti detekce a identifikace nebakteriálních původců v ČR

qPCR

Prostřednictvím přímé multiplexní qPCR, vyvinuté na jednom z pracovišť podílejících se na řešení projektu NEBAKMAS, je možné detekovat jak druhy rodu *Prototheca* nejčastěji se vyskytující v prostředí mléčných farem: *P. bovis*, *P. blaschkeae* a *P. ciferrii*, tak i nejčastějšího původce prototékózy u lidí *P. wickerhamii*. Vyvinutý detekční systém se skládá ze dvou na sebe navazujících multiplexů. Multiplex I detekuje *Prototheca* sp. na základě univerzálních primerů konzervovaného úseku velké ribozomální podjednotky, dále nejčastějšího původce mastitid dojného skotu - *P. bovis*, a interní amplifikační kontrolu, která slouží k odhalení případných falešně negativních výsledků v důsledku inhibice qPCR reakce. Multiplex II je použit v případě, kdy byla pomocí multiplexu I detekována *Prototheca* sp. a nejedná se o *P. bovis*. Multiplex II umožňuje detekovat *P. blaschkeae*, *P. ciferrii* a *P. wickerhamii*.

Vyšetřovaný vzorek mléka je nutné po odběru uchovávat v chladničkové teplotě a doručit do laboratoře co nejdříve, aby mohl být do druhého dne zpracován do mléčné pelety. Připravené mléčné pelety je pak možno uchovávat při teplotě $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ do dalšího použití. Extrakce DNA z mléčných pelet je prováděna prostřednictvím izolačního kitu Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Microprep (Zymo Research, USA) a extrahovaná DNA je následně použita do qPCR reakce. Předností metody qPCR je její schopnost odhalit již nízké koncentrace prototék ve vzorcích, především těch, kde se vyskytují kvasinky, které kultivační vyšetření na prototéku značně komplikují. Limit detekce qPCR byl stanoven na hodnotu $2,0 \times 10^2$ buněk/ml pro *P. bovis*, $4,0 \times 10^3$ buněk/ml pro *P. ciferrii* a $7,5 \times 10^2$ buněk/ml pro *P. blaschkeae*. Tato metoda usnadňuje a urychluje identifikaci infikovaných jedinců ve stádě, jež je následně možné včas separovat od zdravých jedinců a minimalizovat riziko šíření nákazy v chovu. Metoda qPCR je rutinně využívána pro analýzu vzorků kravského mléka na přítomnost prototék v rámci laboratoří Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v.v.i.

MOL-PCR

Dalším molekulárně-biologickým přístupem, který lze využít v rámci diagnostiky nebakteriálních mastitid u mléčného skotu, je multiplexní detekce nebakteriálních agens prostřednictvím metody MOL-PCR. Tato metoda umožňuje kvalitativní detekci a identifikaci

v ČR nejčastěji diagnostikovaných druhů kvasinek (n=7) a prototék (n=3) současně v jediné multiplexní reakci, což minimalizuje náklady vynaložené na vyšetření vzorku. Metoda MOL-PCR využívá sadu oligonukleotidů, které cílí na specifické geny, zejména virulentní faktory, těch zástupců kvasinek a prototék, které jsou významné buď z hlediska klinického onemocnění, nebo mají vliv na technologické vlastnosti mléka: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida inconspicua*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia kudriavzevii*, *Pischia fermentans*, *Yarrowia lipolytica*, *Prototheca bovis*, *Prototheca blaschkeae* a *Prototheca ciferrii*.

Obdobně jako v případě qPCR je nejprve z mléčné pelety, připravené centrifugací vzorku mléka, izolována DNA, jež je následně analyzována v rámci MOL-PCR reakce. Kvalitativní detekce probíhá odečtením fluorescenčního signálu vzorku od negativní kontroly. Metoda MOL-PCR je vhodná pro monitoring výskytu nebakteriálních původců mastitidy prostřednictvím vyšetření vzorků mléka, lze ji však použít i pro analýzu širokého spektra klinických vzorků či vzorků prostředí za účelem posouzení nutnosti zavedení preventivních a kontrolních opatření.

Vlivy nebakteriálních mastitid na dojivost a kvalitu mléka včetně technologických vlastností

Negativní projevy v mléce v důsledku bakteriálních mastitid

Poruchy sekrece mléka jsou, jak známo, trvale jedním z hlavních zdrojů ztrát na produkci a kvalitě mléka, jakkoliv je stále vedena intenzivní aktivita o jejich průběžnou eliminaci. Prevence a léčba mastitid na různé úrovni intenzity a efektivity jsou denní součástí prací v mléčném stádě. Celkové zlepšení zdraví stád dojnic v čase sice existuje, ale není tak významné, jak by být mělo, nebo mohlo. Průměrný PSB v ČR v bazénovém mléce v rocích 2017 až 2020 kolísal mezi 220 až $230 \times 10^3 \text{ml}^{-1}$, zatímco v periodě 2004 – 2012 kolísal mezi 250 – $270 \times 10^3 \text{ml}^{-1}$. Potenciál by mohl být, s ohledem na charakteristiky chovu, kolem 150 až $160 \times 10^3 \text{ml}^{-1}$. Důvodem stále vyšších PSB může být, že chovatelské a veterinární aktivity stále zaostávají za vývojem změn v chovech a prostředí, které umožňují četným původcům mastitid je cestou vlastních biologických možností obcházet. Přispívá tomu také, sice nechtěně a neočekávaně, ale významně vývoj chovatelských technologií (např. stlaní stájí separátem). V současnosti je hlavním problémem zdraví a lékařství především vzrůstající rezistence patogenů (také u mastitid) vůči v praxi dlouhodobě nadužívaným antibiotikům. Uvedené omezuje možnosti efektivní léčby a zvyšuje náklady. To zakládá potřebu vývoje dalších antibiotik, který se však již stává výsledkově méně efektivní.

Bakteriální subklinické mastitidy, co se týče škod na produkci a kvalitě mléka, jsou mnohdy závažnější, než klinické, které zase více ohrožují zdraví, někdy i život hospodářských zvířat. Po hlavním dřívějším původci mastitid, *Streptococcus agalactiae*, se začaly rozšiřovat prostředkové mastitidy s původci *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* a koliformní bakterie obecně, atp. Prostředkové mastitidy převážily nad kontagiózními. Samotný průběh infekce mléčné žlázy snižuj dojivost a zejména kvalitu mléka. Hlavním ukazatelem pro indikaci mastitidy, vedle přítomnosti patogena, je počet somatických buněk (PSB).

Změny, nezřídka škodlivé, v důsledku výskytu bakteriálních zánětů mléčné žlázy:

- zvýšený PSB je důsledkem mastitidy, patogenní infekce mléčné žlázy;
- zvýšený PSB bývá provázen ztrátami dojivosti hospodářských zvířat;
- další podstatná ztráta je na kvalitě mléka zvířat se zvýšeným PSB;

- zánětlivý proces, vysoký PSB, redukuje obsah laktózy v mléce, poškozením sekrečního epitelu a zvyšuje obsah chloridů;
- vysokým PSB (zvýšené gama-globuliny) při mastitidě jsou narušeny fermentační procesy i koagulace mléka;
- vysoký PSB při mastitidě zhoršuje termostabilitu bílkovin pro všechny trvanlivé mléčné výrobky;
- vysoký PSB může souviset se zhoršenými reprodukčními schopnostmi krav (např., krávy s výskytem ovariálních i luteálních cyst a nebo endometritid vykazují v průměru PSB o $20 \times 10^3 \text{ml}^{-1}$ vyšší).

V ČR byly odhadnuty náklady (ztráta) na případ především bakteriální mastitidy na částku cca 9 000 Kč (Kvapilík et al., 2015). Vlivem vysoké inflace ovšem (2022 a 2023), kvalifikovaným odhadem, lze počítat nyní s částkou cca 14 000 Kč. Co však může být stále platné, je relativní rozdělení této ztráty: - srážky z ceny mléka 6 %; - spotřeba práce navíc 7 %; - veterinární zákroky 14 %; - obrat stáda 20 %; - zákaz prodeje mléka 17 %; - snížená mléčná užitkovost 37 %.

Snížení dojvosti v důsledku mastitidy, zejména subklinické, lze podle hodnoty PSB, tedy podle závažnosti onemocnění, vyčíslit přibližně takto:

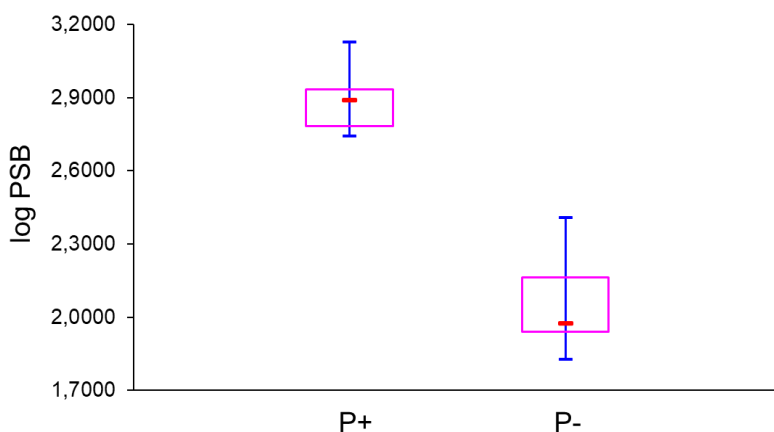
- podle bazénového mléka:
 - $\text{PSB} \leq 50 \times 10^3 \text{ml}^{-1}$, ztráta 0 %;
 - 51 až 100, 3,3; - 101 až 200, 6,6;
 - 201 až 300, 8,6; - 301 až 400, 10,0;
 - 401 až $500 \times 10^3 \text{ml}^{-1}$ a výše, 11,0 a více %.
- podle individuálních vzorků mléka v kontrole užitkovosti (Reneau et al., 1988):
 - $\text{PSB} 0$ až $34 \times 10^3 \text{ml}^{-1}$, 1. laktace 0 % a 2. a další laktace 0 %;
 - $\text{PSB} 35$ až 70, 1. 0 % a 2. a další 1 %;
 - $\text{PSB} 71$ až 140, 1. 1,5 a 2. a další 2,5;
 - $\text{PSB} 141$ až 282, 1. 3,3 a 2. a další 5,0;
 - $\text{PSB} 283$ až 565, 1. 5,1 a 2. a další 7,4;
 - $\text{PSB} 566$ až 1 130, 1. 6,6 a 2. a další 9,9;
 - $\text{PSB} 1 131$ až 2 262, 1. 8,4 a 2. a další 12,6;
 - $\text{PSB} 2 263$ až 4 525, 1. 9,9 a 2. a další 15,0;
 - $\text{PSB} 4 526 \times 10^3 \text{ml}^{-1}$ a více, 1. laktace 11,7 % a 2. a další laktace 17,5 %.

Je zcela zjevné, že ještě při hygienicko-zdravotním limitu PSB pro standardní mléko $400 \times 10^3 \text{ml}^{-1}$ (EU) se jedná o ztrátu na produkci mléka cca 10 %, což může odpovídat výskytu subklinických mastitid ve stádě 25 až 35 %. Tedy rezervy ve zvyšování efektivity mléčné produkce péčí o snížení PSB (hygienická prevence mastitid) jsou stále významné.

Negativní projevy v mléce v důsledku nebakteriálních mastitid

Současně vzrůstá vliv nebakteriálních mastitid řasy *Prototheca bovis* (P). V pokusném sledování byla prevalence prototéka pozitivních dojnic (P+) ve stádě 26,5 %, jako hlavní příčina mastitid v chovu dojnic. Byly zaznamenány výrazné korelace (0,81 až 0,86) mezi PSB a počtem prototék (P) v bazénových vzorcích mléka. Vyšší PSB byl u mléka (dojnic) P+ (geometrický průměr 777 vs. $114 \times 10^3 \text{ml}^{-1}$; Obr. 1). To naznačilo závažnou situaci v chovu z hlediska zpeněžení mléka. Bylo poukázáno na nutnost vylučování značné části mléka z dodávky a nezanedbatelné finanční ztráty.

Obr. 1 Rozdíl v PSB (log PSB) u P+ a P- (prototéka) zvířat v bazénových vzorcích mléka (n = 6 a 6, medián, variační rozpětí, 2. a 3. kvartil).



Souběžně bylo zachyceno snížení dojivosti u zvířat P+, o 7,1 %, což je srovnatelné s bakteriálními mastitidami. Proto lze použít podobné vzorce ocenění těchto ztrát. To logicky vedlo k dalším ztrátám na zpeněžování. Celkový počet mikroorganismů byl nižší u mléka P- než u P+ ($2,3$ vs. $2,5 \times 10^5$ KTJ ml⁻¹). Prototékové mastitidy tak představují rovněž problém pro hygienickou kvalitu mléka. U mléka P+ byl zjištěn nižší obsah tuku (3,47 vs. 4,06 %), bílkovin (3,96 vs. 4,06 %), kaseinu (3,18 vs. 3,24 %), laktózy (4,75 vs. 4,87 %, zřetelný vliv mastitidy) a tukuprosté sušiny (TPS). To může být zčásti zapříčiněno vyšším podílem krav ke konci laktace u mléka P-. S výjimkou TPS (9,32 vs. 9,53 %) se jednalo o nevýznamné rozdíly. Přesto je tendence snižování obsahu složek obecně v souladu se změnami ve složení mléka vlivem bakteriálních zánětů mléčné žlázy (Kvapilík et al., 2014, 2015, 2017). U mléka P+ byl lepší bod mrznutí mléka (-0,536 vs. -0,530 °C), což souvisí s vyšším obsahem osmoticky aktivních iontů vlivem mastitidy (Hanuš et al., 2023). To potvrdila vyšší elektrická vodivost u mléka (dojnic) P+ (4,31 vs. 3,98 mS.cm⁻¹), opět v souladu s obecným trendem u mastitid. Nižší titrační kyselost u mléka P+ (7,14 vs. 7,9 °SH) logicky poukazuje na alkalizaci mléka v důsledku mastitidy, podobně jako u bakteriální mastitidy. Kysací schopnost mléka P+ jogurtovým testem byla snížena (23,3 vs. 25,1 mS.cm⁻¹), mléko tak bylo horší pro fermentační zpracování.

Jak prokázaly výsledky případové studie, nebakteriální mastitidy způsobují ztráty na dojivosti a kvalitě mléka zcela v charakteru srovnatelné s negativními dopady výskytu častějších bakteriálních mastitid. Četnost těchto případů zvýšeného výskytu prototekálních mastitid ve stádech dojnic v ČR byla odhadnuta na 4,37 %.

Celkově lze k této problematice vlivu nebakteriálních mastitid na množství a kvalitu mléka u dojnic, z praktického hlediska, shrnout:

- zdroje kontaminace zvířat a mléka infekcí *Prototheca* spp. jsou prakticky velmi obtížně identifikovatelné, může jít o biofilmy z vnitřních povrchů dojícího zařízení;
- léčba je naprosto neúčinná, všechny pozitivní dojnice musí být vyřazeny;
- situace je mlékařskou praxí v ČR zatím obecně podceňována, i když riziko časem vzrůstá, což je potřebné změnit;
- ekonomické ztráty jsou velmi podobné ostatním etiologiím mastitid, tedy, hospodářsky závažné;
- značný význam má hygiena a prevence;

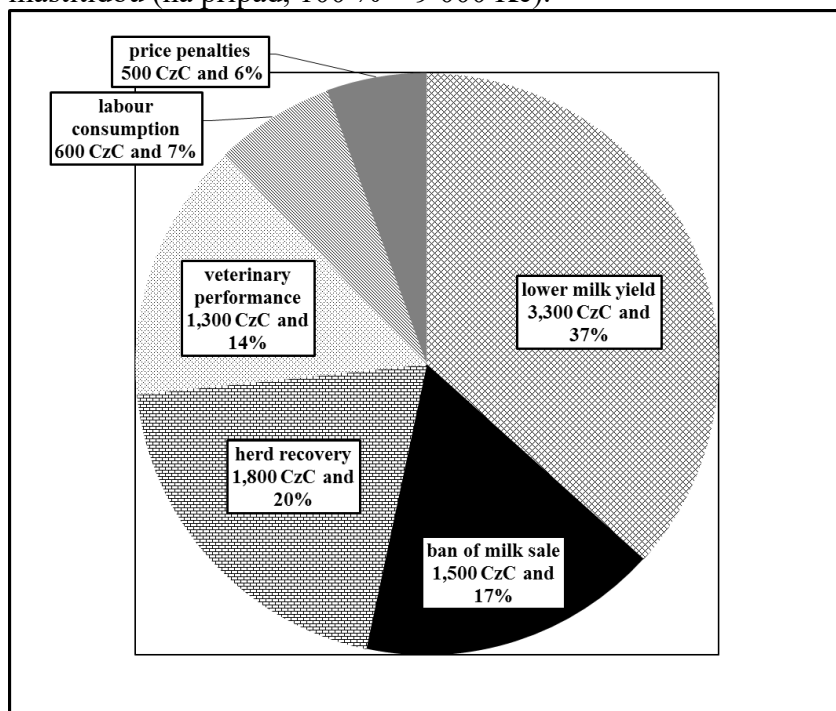
- k eradikaci této mikrobiální zátěže jsou účinné pouze kyselé dezinfekční prostředky (na vybrané povrchy prostředí a dojíčho zařízení), alkalické jsou bez účinku na vitalitu, nicméně, také přispívají k eliminaci biofilmů.

Další závěry k výskytu nebakteriálních mastitid mohou naznačovat:

- infekce *Prototheca* spp. (P) je častější u starších krav kolem 3. laktace a je záležitostí spíše počátku laktace, kdy je zvýšena vnímavost vůči mastitidám obecně;
- infekce P, pravděpodobně v kombinaci i s jinými patogeny (*Str. uberis*), snižuje výrazněji užitkovost dojnic, cca 7 % a možná více;
- infekce P, pravděpodobně v kombinaci s jinými patogeny (*Str. uberis*), zvyšuje výrazněji PSB, stejně jako elektrickou vodivost, při zlepšení bodu mrznutí mléka;
- z technologických vlastností je u P zhoršena alkoholová stabilita a je také alkalizováno mléko (nižší titrační kyselost);
- další mírné zhoršení technologických vlastností u P lze zachytit u kysací schopnosti mléka.

Na základě výše uvedeného je možné odhadovat, že relativní rozložení ztrát z nebakteriálních mastitid by mohlo být, s drobnou změnou přesunu části nákladů za veterinární péči do položky obratu stáda (50 % kvalifikovaným odhadem), podobné rozložení ztrát z bakteriálních mastitid (Obr. 2).

Obr. 2 Struktura nákladů a ztrát (Kvapilík et al., 2015) zapříčiněných především bakteriální mastitidou (na případ, 100 % = 9 000 Kč).



Srážky z ceny 6 %; spotřeba práce navíc 7 %; veterinární zákroky 14 %; obrat stáda 20 %; zákaz prodeje mléka 17 %; snížená mléčná užitkovost 37 %.

Z uvedeného vyplývá, že efektivní realizace všech známých účinných antimastitidních opatření ve stádech dojených zvířat zaměřená k postupné eliminaci klinických a subklinických bakteriálních i nebakteriálních mastitid a snižování PSB budou zvyšovat kvalitu mléka i dojvost zvířat, tedy zlepšovat ekonomiku chovu.

Nově získané výsledky a poznatky vedoucí k analýze příčin, zdrojů variability i možnostem eradikace negativního jevu výskytu nebakteriálních mastitid jsou pro mlékařskou praxi velmi významné, s možností pozitivního příspěvku k ekonomice produkce mléka a zdravotním otázkám v mlékařství. Významnou položkou jsou i hygienické studie chování těchto nebakteriálních patogenů v technologických biofilmech, které umožňují účinně modifikovat nezbytnou sanitaci technologie k žádoucí eliminaci šíření těchto patogenů, proto je potřebné v těchto studiích pokračovat co nejefektivněji.

Srovnání „novosti postupů“ oproti původní metodice, případně jejich zdůvodnění, pokud se bude jednat o novou metodiku (§ 2, odst. 1, písm. b) a písm. c) zákona č. 130/2002 Sb.):

Vyvinutá certifikovaná metodika je předávána pro podporu kvality v mlékařství ČR do prostředí prvovýroby mléka (implementace také formou semináře), nákupu syrového mléka, veterinární praxe a zemědělského školství, v elektronické formě od počátku roku 2023.

Jedná se o nový postup v podmínkách ČR, ačkoliv riziko nebakteriálních původců mastitid bylo v ČR zmíněno již dříve (Bzdil, 2013), nicméně, rozsah a provedení této projektové (MZe NAZV Země QK 1910092) studie přineslo nové výsledky a tím i praktické interpretace a postupy. Část metodiky navazující na mastitidy bakteriální je pak rozšířením dosavadních poznatků a dále uvedením známých poznatků v nových souvislostech. Jedná se prakticky o rozšíření metodického portfolia v rámci prevence a eliminace provozních zdravotních poruch sekrece mléka dojníc a tím podpory zdraví dojníc, kvality mléka a bezpečnosti mléčného potravinového řetězce.

Část uvedených postupů byla již prakticky používána dříve, ale v rámci potenciálu eliminace nebakteriálních mastitid jsou postupy navrhovány nově, na bázi nově získaných poznatků.

Popis uplatnění metodiky:

Metodika je určena pro širokou odbornou veterinární a zemědělskou veřejnost, bude poskytnuta bezplatně na webových stránkách autorů. Metodika udává směr a postupy pro chovatele mléčného skotu, jak technicky eliminovat nebezpečí výskytu nebakteriální mastitid a jak identifikovat na pracovištích autorů (VÚVeL a SVÚ) a laboratoři firmy VEDIA Strakonice. Této firmě, která se na řešení projektu podílela, patří jí za její spolupráci velký dík od autorů.

Smluvně bude nabídnuta uživatelům jak z oblasti prvovýroby mléka (Svaz výrobců mléka Šumperk), tak zpracovatelům mléka (Českomoravský svaz mlékárenský). Smlouvy s těmito uživateli jsou přílohou této metodiky.

Průběžné výsledky řešení projektu byly prezentovány na čtyřech pracovních workshopech pro odbornou veřejnost v letech 2020 – 2022.

Ekonomické aspekty — odhad nákladů (v tis. Kč) na zavedení postupů uvedených v metodice a odhad ekonomického přínosu (v tis. Kč) pro uživatele:

Ekonomický dopad je součástí kontroly mléčné užitkovosti krav a kvality jejich mléka. Vyvinutý postup podporuje kontrolu zdraví zvířat a kvality mléka a mléčných

výrobníků. Na úrovni státu může ročně přínos z redukce ztráty efektivity mlékařství v důsledku výskytu nebakteriálních mastitid činit částky v řádu milionů, skutečný odhad je obtížný.

Náklady na konkrétní zavedení a využití postupu uvedeného v metodice mohou pro uživatele (servisní organizace, nepřímý uživatel) činit podle kvalifikovaného odhadu v KU celkem 40 tis. Kč jednorázově (náklady na proškolení relevantních pracovníků). Přínos pro nepřímého uživatele je v rozšíření portfolia působnosti (v případě servisního podniku) a v podpoře dojivosti krav a kvality mléka (v případě chovatele dojnic). Tento efekt podpory dojivosti a kvality lze odhadnout na 100 tis. Kč ročně při vzrůstu zájmu o službu chovatelům.

V případě použití metodiky přímým uživatelem (chovatel dojnic) postupně po její implementaci může uvést odborná kalkulace: hmotnost nakoupeného syrového mléka v ČR (MZe, 2022) je (x) 3 172 610 000 kg. Situace závažnějších nebakteriálních mastitid se týká cca 5 % (prototéka 4,37 %) stájí, tzn. (x₁) 158 630 500 kg mléka. Zde ztráta dojivosti může činit 7,1 %, tzn. (x₂) 11 262 765 kg mléka. Efektivním využitím implementované certifikované metodiky eliminace vlivu nebakteriálních mastitid může být, kvalifikovaným odhadem, návratnost cca 50 %, tzn. (x₃) 5 631 383 kg mléka. Cena mléka může být aktuálně 12,0 Kč za kg, tzn. recovery (x₄) 67 576 596 Kč. Relativní ztráta mléka tvoří 37 % případu mastitidy (relativní rozdělení ztráty na mastitidu: - srážky z ceny mléka 6 %; - spotřeba práce navíc 7 %; - veterinární zákroky 7 %; - obrat stáda 27 %; - zákaz prodeje mléka 17 %; - snížená mléčná užitkovost 37 %) a plus je zde 63 % ostatních ztrát, tzn., bilančně, celkový přínos (přínos ze zvýšené dojivosti a úspory zbytečných vícenákladů) metodiky prvovýrobě mléka může činit (x₅) 182 639 440 Kč ročně, plus obtížně změřitelný a vyčíslitelný vzrůst kvality mléčných výrobníků.

Tyto efekty jsou opakovatelné po rocích. Uvedené může přispět k vzrůstu efektivity mlékařství v ČR.

Seznam použité související literatury:

Baumgartner, Ch. und Expertengruppe für Qualitätssicherung und Qualitätsmanagement (2000): *Qualitäts 2000. Leitfaden für den Betrieb von Routine – Untersuchungsgeräten in Rohmilch – Prüfungslaboratorien*, 1. Ausgabe, Oktober: 32.

Bzdil, J. (2013): Řasy z rodu *Prototheca* jako původci mastitid skotu. *Veterinářství*, 3: 218-223.

Ely, V. L., Gressler, L. T., Sutili, F. J., Ribeiro, M. G., Matiuzzi da Costa, M., Castagna de Vargas, A., de Avila Botton, S. (2019): Biofilm formation by *Prototheca zopfii* isolated from clinical and subclinical bovine mastitis in distinct growth conditions under different dyes. *Ciencia Rural*, 49(2): 1-7.

Gelgie, A. E., Korsá, M. G., Dego, O. K. (2022): *Mycoplasma bovis* mastitis. *Curr. Res. Microb. Sci.*, 3: 1-7.

Jagielski T, Gawor J, Bakula Z, Decewicz P, Maciszewski K, Karnkowska A. *cytb* as a New Genetic Marker for Differentiation of *Prototheca* Species. *J Clin Microbiol.* 2018 ;56(10):e00584-18.

Klimesová, M., Kucharovičová, I., Morávková, M., Bačová, R., Roubal, P., Seydlová, R., Nejeschlebová, L. (2020): Sledování tvorby biofilmu a termorezistence u řas *Prototheca* spp. izolovaných z bazénových vzorků mléka. Mlék. listy – zprav., 31, 179(2): 13-18.

Klimesová, M., Nejeschlebová, H., Kucharovičová, I., Roubal, P., Seydlová, R. (2022): Tvorba biofilmu kvasinek izolovaných ze syrového mléka a účinnost dezinfekčních prostředků. Mlék. listy – zprav., 191, 33(2): 1-8.

Kvapilík, J., Hanuš, O., Syrůček, J., Vyletělová Klimesová, M., Roubal, P.: The economic importance of the losses of cow milk due to mastitis: a meta-analysis. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 20, 6, 2014, ISSN 1310-0351, 1501-1515.

Kvapilík, J., Hanuš, O., Bartoň, L., Vyletělová Klimesová, M., Roubal, P.: Mastitis of dairy cows and financial losses: an economic meta-analysis and model calculation. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 21, 5, 2015, ISSN 1310-0351, 1092-1105.

Kvapilík, J., Jedelská, R., Hanuš, O., Urban, P., Říha, J., Kopunecz, P., Seydlová, R., Roubal, P., Zlatníček, J., Klimes, M.: Somatické buňky v mléce individuálních krav a vybrané ukazatele. Mlékařské listy - zpravodaj, 27, 158, 5, ISSN 1212-950X, 2016, 5-12.

Kvapilík, J., Hanuš, O., Roubal, P., Říha, J., Urban, P., Jedelská, R., Seydlová, R., Klimesová, M., Kopunecz, P.: Somatic cells in bulk samples and purchase prices of cow milk. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., 65, 3, ISSN 1211-8516, 2017, 879-892.

Kvapilík, J., Kučera, J., Hanuš, O., Říha, J., Seydlová, R., Urban, P., Kopunecz, P.- Jedelská, R.: Zdravotní stav mléčné žlázy, jakost a nákupní ceny mléka. Náš chov, LXXVII, 5, ISSN 0027-8068, 2017, 25-28.

Kwiecinski, J. (2015): Biofilm formation by pathogenic *Prototheca* algae. Lett. Appl. Microb., 61: 511-517.

Libisch, B., Picot, C., Ceballos-Garzon, A., Moravkova, M., Klimesova, M., Telkes, G., Chuang, S. T., Le Pape, P. (2022): *Prototheca* Infections and Ecology from a One Health Perspective. Microorganisms, 2022, 10, 938.

Mašek, J., Šašková, K., Rychlíková, M., Hegedüšová, Z., Hanuš, O., Kučera, J., Holásek, R. (2022): Antimastitidní vakcinace jako varianta redukce použití antibiotik u dojnic – případová studie. Mlék. listy – zprav., 33, 191(2): 8-13.

Milanov D, Petrović T, Polaček V, Suvajdžić L, Bojkovski J. Mastitis associated with *Prototheca zopfii* - an emerging health and economic problem on dairy farms" J Vet Res. 2016; 60(4), 373-378.

Morandi, S., Cremonesi, P., Capra, E., Silvetti, T., Decimo, M., Bianchini, V., et al. (2016): Molecular typing and differences in biofilm formation and antibiotic susceptibilities among *Prototheca* strains isolated in Italy and Brazil. J. Dairy Sci., 99(8): 6436-6445.

Morávková, M., Bačová, R., Beinhauerová, M., Klimesová, M., Seydlová, R., Kucharovičová, I. (2022): Identifikace řasy *Prototheca* spp. pomocí qPCR a testování

citlivosti *Prototheca bovis* k amfotericinu B, nystatinu a flukonazolu. Sborník, 29. kongres ČSSM, 28. Moravsko-slovenské mikrobiologické dny, Brno 15. - 17. 9.

Nejeschlebová, H., Hanuš, O., Seydlová, R., Kopecký, J., Jedelská, R. (2022): Mléčná užitkovost a kvalita mléka při subklinických mastitidách způsobených řasou *Prototheca*. Fenotyp DKU.CZ, 1: 12-16.

Seydlová, R., Roubal, P., Hanuš, O., Střelečková, V., Babák, V., Morávková, M. (2022): Výskyt nebakteriálních původců mastitid v bazénových vzorcích mléka (2019 - 2022) v České republice. Náš chov, 12: 53-55.

Seydlová, R., Roubal, P., Kucharovičová, I., Bačová, R., Morávková, M. (2019): Výskyt nebakteriálních původců mastitid v bazénových vzorcích mléka v ČR. Veterinářství, 69(12): 861-866.

Seydlová, R., Snášelová, J., Soukupová, A. (2009): Vliv obsahu *Prototheca zopfii* a *Candida lusitanae* na kvalitu syrového mléka. Mlék. listy – zprav., 112: 15-22.

Shave, C. D., Millyard, L., May, R. C. (2021): Now for something completely different: *Prototheca*, pathogenic algae. PLoS Pathogens, 17(4).

Vyletěllová - Klimešová, M., Hanuš, O., Dufek, A., Němečková I., Nejeschlebová, L., Horáček, J., Ponížil, A. (2014): *Staphylococcus aureus* and other pathogens in relation to breed of cattle and somatic cell count. Bulg. J. Agric. Sci., 20(6): 1495-1500.

Zarora, L., Valenzuela, K., Kruze, J. (2011): Bovine mastitis caused by *Prototheca zopfii*: first isolation in Chile. Arch. Med. Vet., 43: 173-176.

Seznam publikací, které předcházely metodice a byly publikovány:

V rámci řešení projektu od roku 2019 do roku 2022 byly slněny všechny plánované výsledky:

Č. výsledku	Výsledek	Druh výsledku	Dosažen
QK1910092-V1	Význam nebakteriálních patogenů jako původců mastitid	Jost	12/2019
QK1910092-V2	Príspevek na konferenci týkající se detekce, identifikace a charakterizace nebakteriálních původců mastitid.	O	11/2019
QK1910092-V3	Výsledky prvního roku depistáže zaměřené na detekci nebakteriálních původců mastitid – <i>Prototheca</i> spp. a kvasinek v České republice	Jost	12/2020
QK1910092-V4	Workshop pro prvovýrobce mléka a veterináře zaměřený na opatření ke snížení výskytu nebakteriálních původců mastitid na farmách I	W	11/2020
QK1910092-V5	Záchyty vybraných nebakteriálních mastitidních patogenů na farmách v ČR	Jost	12/2020
QK1910092-V6	Charakterizace nebakteriálních původců mastitid	Jimp	12/2021
QK1910092-V7	Multiplexní metoda detekce a identifikace vybraných původců mastitid nebakteriálního původu	Gfunk	12/2021
QK1910092-V8	Průběžné výsledky monitoringu výskytu nebakteriálních patogenů v prvovýrobě mléka	Jost	12/2021
QK1910092-V9	Príspevek na konferenci ohledně vlivu biocidních látek na nebakteriálních mastitidních patogeny	O	12/2021

QK1910092-V10	Uspořádání workshopu na téma - proč sledovat řasy a kvasinky jako původce mastitid v chovech dojnic.	W	12/2021
QK1910092-V11	Vliv nebakteriálních původců mastitid na technologické vlastnosti mléka	Jost	12/2021
QK1910092-V12	Výskyt vybraných nebakteriálních původců mastitid na farmách v ČR a možná protipatření	O	12/2021
QK1910092-V13	Využití multiplexní molekulární detekce a identifikace pro vybrané zástupce mastitid nebakteriálního původu	Jimp	12/2021
QK1910092-V14	Workshop pro prvovýrobce mléka a veterináře zaměřený na opatření ke snížení výskytu nebakteriálních původců mastitid na farmách II	W	12/2021
QK1910092-V15	Komplexní technické řešení přístupu k detekci a identifikaci vybraných původců mastitid nebakteriálního původu	Fuzit	10/2022
QK1910092-V16	Možnosti zlepšení mastitidní situace v chovech dojeného skotu snížením výskytu nebakteriálních patogenů	O	04/2022
QK1910092-V17	Příspěvek na konferenci zaměřený na molekulární multiplexní detekci a identifikaci nebakteriálních původců mastitid	O	09/2022
QK1910092-V18	Souhrnné výsledky o výskytu vybraných nebakteriálních původců mastitid dojeného skotu v ČR	Jost	12/2022
QK1910092-V19	Význam vybraných nebakteriálních původců mastitid pro zpracovatele mléka	O	12/2022

V průběhu řešení byly dále realizovány další výsledky s dedikací na projekt v počtu cca 10, typů Jost, Jimp, W a O.

Jména oponentů a názvy jejich organizací:

Odborník z daného oboru:

Prof. MVDr. Lenka Vorlová, Ph.D., Veterinární univerzita Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, vorloval@vfu.cz

Pracovník státní správy:

MVDr. Jana Horňáčková, SVS Praha, Oddělení veterinární hygieny, j.hornackova@svscr.cz

Organizace pro vydání osvědčení:

Státní veterinární správa Praha

Dedikace projektu:

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu č. QK1910092 s názvem: „Nebakteriální původci mastitid a jejich vliv na kvalitu a technologické vlastnosti mléka“ a podpory na rozvoj výzkumné organizace č. MZE-RO1423 a MZE-RO0523