



# MSD Farmářské Fórum

**Jak číst svět**



**3. ročník MSD Farmářského Fóra  
1. - 2. 10. 2016 | Hotel Na Farmě**



# Faremní kultivace původců mastitid pomocí PM testu

Prezentace vychází ze zavádění PM testu

- na více než 150 farmách mléčného skotu
- ve stádech 50 až 1200 dojnic

# Dotace na faremní diagnostiku 2016

Dotace Q CZ je poskytována na základě Pokynů EU ke státní podpoře v odvětvích zemědělství a lesnictví a ve venkovských oblastech na období do r.2020

19.A.a  
certifikace

19.A.a.2  
Služby,  
studie trhu

19.A.b.1  
závazná  
kontrolní  
opatření

20.A.e  
ochlazení  
stáje

20.A.b  
faremní  
diagnostika

20.A.c  
dezinfekce  
bezstelivo-  
vého lože

## ■ 20.A.b. Podpora provádění faremní diagnostiky původce mastitid dojnic

### V rámci faremní diagnostiky původce mastitidy dojnic žadatel:

- zajistí u dojnic zapojených v kontrole mléčné užitkovosti metody A plošné stanovení počtu somatických buněk v individuálních vzorcích mléka,
- provádí faremní kultivaci původců mastitid pomocí diagnostických setů,
- zajistí minimálně 1 x ročně vyšetření bazénového vzorku mléka pomocí metody PCR v akreditované laboratoři.

# PM test obsahuje

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



# Postup provedení PM testu

- Mléko nanese na povrchy všech tří agarů , misku PM testu uzavřeme víčkem a v pozici dnem vzhůru uložíme do inkubátoru.
- Inkubujeme při teplotě  $37,5 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$  a 55% relativní vlhkosti po 22 – 26 hodin. Tato doba je dostačující k nárůstu mikrobiálních kolonií ze zárodků přítomných v naneseném vzorku mléka .
- K inkubaci můžeme použít medicínský nebo jiný komerčně dostupný inkubátor, rozhoduje citlivost a udržení požadovaných parametrů

# Schéma použití setů pro faremní kultivaci

**KONTROLA  
UŽITKOVOSTI**

Kriteria např.:  
90 dnů po porodu  
50% nárůst SB

**KLINICKÁ  
MASTITIDA**



*Escherichia coli*,  
*Klebsiella oxytoca*,  
*Enterobacter cloacae*,  
*Serratia marcescens*

*Candida rugosa*,  
*Prothoteca*

Bez nálezů  
patogenů

*Aerococcus viridans*,  
*Streptococcus dysgalactiae*,  
*Staphylococcus chromogenes*,  
*Staphylococcus sciuri*

*Staphylococcus aureus*,  
*Streptococcus agalactiae*,  
*Streptococcus uberis*,  
*Streptococcus parauberis*

Léčba klinických  
příznaků bez  
ATB

Specifická léčba  
bez ATB

Léčba bez ATB

Intramamární  
LC ATB

Specifická  
cílená léčba ATB

# Schéma použití setů pro faremní kultivaci

ZAPRAHOVÁNÍ



Bez nálezu  
patogenů

*Streptococcus agalactiae*,  
*Str. dysgalactiae*,  
*Sta. chromogenes*,  
*Staphylococcus sciuri*

*Staphylococcus aureus*,  
*Streptococcus uberis*,  
*Streptococcus parauberis*

Bariérová  
uzávěra

Bariérová  
uzávěra,  
intramamární  
DC s ATB

Specifická cílená  
léčba ATB,  
bariérová uzávěra,  
DC se synerg. ATB



# Standardní způsoby použití PM testu

- Systém ozdravení stáda dojnic od kontagiózních mastitid (modelový příklad *Staphylococcus aureus*)
- Systém depistáže dojnic vylučujících mlékem kvasinky (modelový příklad *Candida rugosa*)
- Systém stanovení správného protokolu léčby u rekurentních mastitid (modelový příklad *Streptococcus uberis*)
- Rozlišení koaguláza negativních stafylokoků jako původců mastitid
- Systém diferencovaného zaprahování dojnic

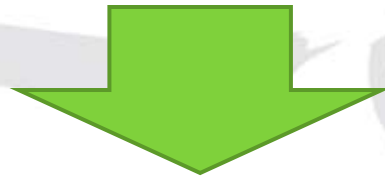
# OZDRAVENÍ STÁDA DOJNIC OD KONTAGIÓZNÍCH MASTITID

- Nakažlivé mastitidy - problém v 30% chovů v ČR, přenos na dojírně
- Nejvíce ohrožené jsou dojnice do 3 týdnů po otelení
- Rychlost šíření ve stádě závisí na úrovni zavedeného protokolu dojení a zoohygieně dojení od stabilizovaného stavu až po 50% nárůst infikovaných dojnic za rok
- Bakterie : *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus agalactiae*

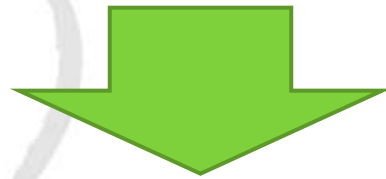
Opatření se zaměřují na snížení infekčního tlaku

# Jak dojde v chovu k nárůstu počtu kontagiózních mastitid ?

Stres, nízká úroveň hygieny dojení, zavléčení kontagiózní bakterie, selhání protinákazových opatření na dojírně



Nárůst počtu mastitid ve stádě, vzestup PCB v bazénových vzorcích, zahájení paušální léčby všech dojnic s vysokým PSB „co nejlepším“ ATB



Při špatném protokolu dojení je počet nakažených dojnic větší než počet vyléčených, část mastitid přechází do subklinické formy, část recidivuje, dochází k náhlým výkyvům kvality mléka (sezónní stres)

# OZDRAVENÍ STÁDA DOJNIC OD KONTAGIÓZNÍCH MASTITID

## Streptococcus agalactiae

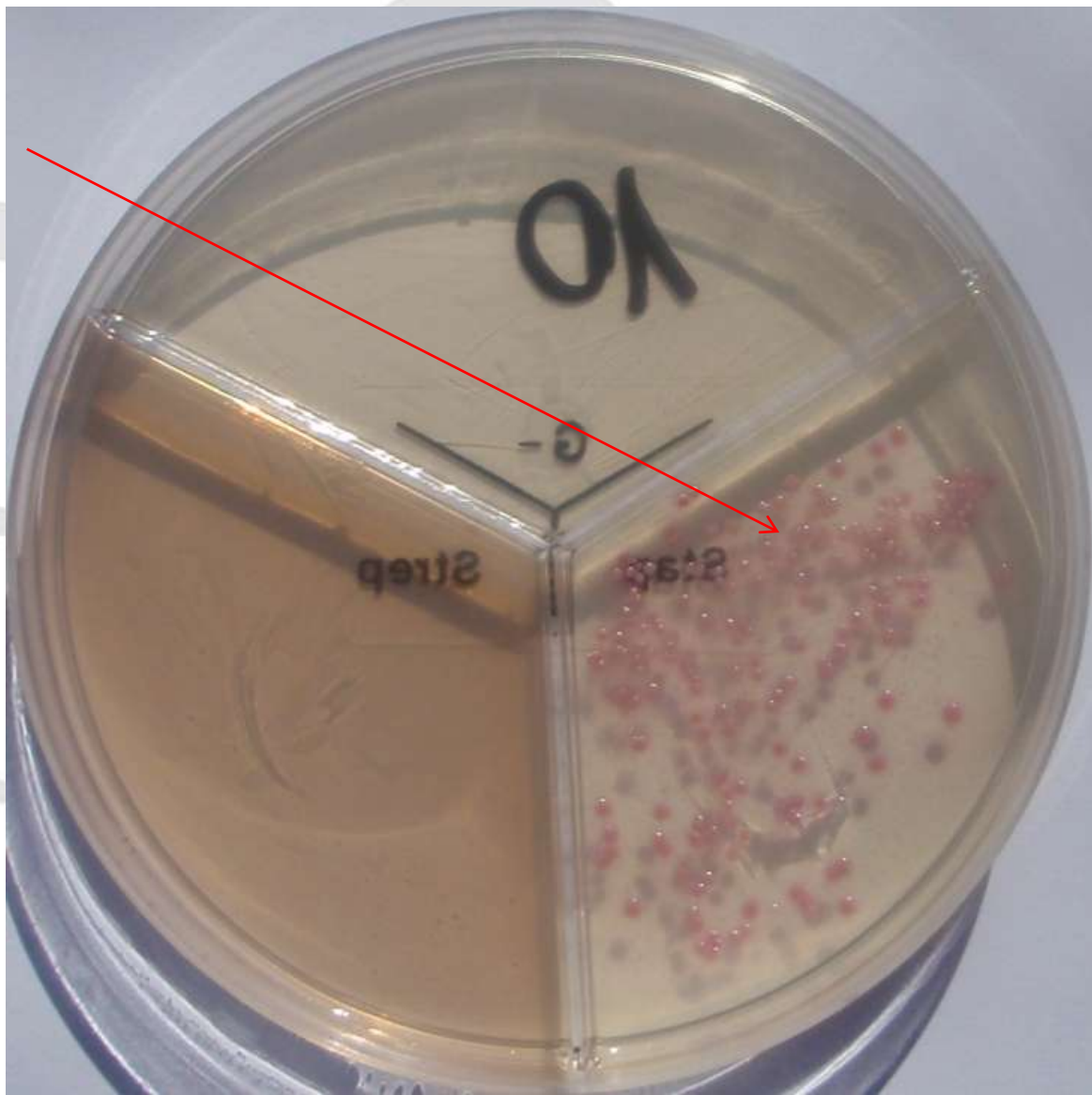
- Na PM testu roste v světlemodrých koloniích na STR sektoru
- Léčba intramammární, vysoce úspěšná
- Na farmách ČR v současné době méně častý nález



# OZDRAVENÍ STÁDA DOJNIC OD KONTAGIÓZNÍCH MASTITID

## Staphylococcus aureus

- Na PM testu roste v růžových koloniích na STA sektoru
- Subklinické, recidivující (po 5 týdnech) mastitidy
- Vytváří „depa“ v horních partiích mléčné žlázy
- Léčí se při zaprahování
- Pro ozdravení stáda nutný systém opatření



# SYSTÉM OPATŘENÍ K OZDRAVENÍ STÁDA - **A**

Zvýšení imunity zvířat ( !stres, kvalita krmiv, virové infekce ! )

Omezení vstupních bran infekce ( prevence poškození ústí strukových kanálků – včasná výměna strukových násadců, seřízení dojírny)

Účinná zoohygienická opatření na dojárně ( protokol dojení zahrnující kvalitní, dostatečně dlouho působící pre-dip, rukavice, režim jedna utěrka – jedna kráva, mezistruková dezinfekce, post-dip, čistota, sanitace)

Cíl: snížení infekčního tlaku na zdravé dojnice

# SYSTÉM OPATŘENÍ K OZDRAVENÍ STÁDA - B

## Depistáž pomocí PM testu na třech úrovních

1. Kontrola mastitid na přítomnost *S.aureus* co nejdříve po otelení a cílená parenterální a intramamární ATB léčba (úspěšnost je 70% do 1 měsíce post partum)
2. Depistáž s využitím dostupných dat – nárůst PCB po pravidelných reinfekcích je měsíčně více než 100%. Výběr takto postižených dojnic z dat KU nám umožní záchyt subklinických mastitid *S.aureus*
3. PM test se směsným vzorkem mléka od každé zaprahované krávy. Pozitivní dojnice + záchyt *S.aureus* v úrovni 1. a 2. = terapie ATB parenterálně, DC s odpovídajícím ATB a zátkou intramamárně

# SYSTÉM OPATŘENÍ K OZDRAVENÍ STÁDA - C

## Možnosti ke snížení počtu krav vylučujících *S.aureus* ve stádě

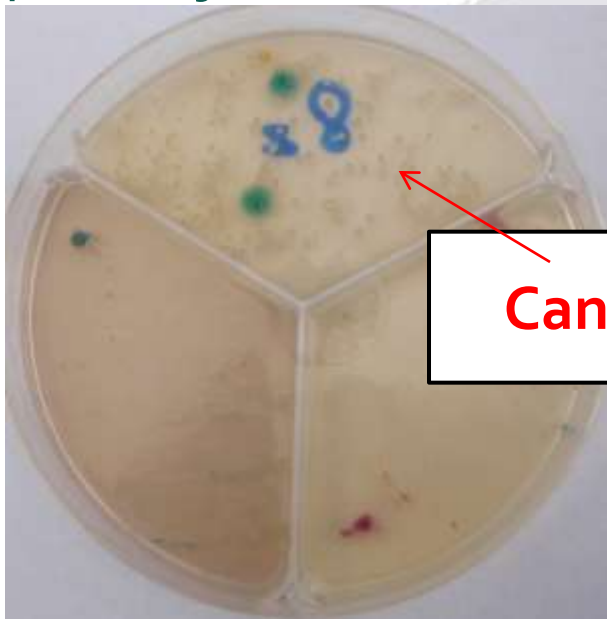
- A. Vysoký počet infikovaných kusů zpravidla neumožňuje radikální řešení vyřazením z chovu (únosné do 1% dojnic)
- B. Po léčbě, i když *S. aureus* přežije v „depu“, dojnice několik týdnů nevylučuje patogen v mléku, což umožní ponechat dojnici v produkční skupině. Akceptujeme několik terapií při reinfekcích - rozhoduje procento léčených krav (do 5%) a ekonomické hledisko
- C. Pozitivní krávy se soustředí do skupiny a tu dojíme separovaně, na konci dojícího cyklu. V případě velkého postižení stáda a rizika velkého výpadku mléka z dodávky je možné u této skupiny jít cestou úpravy krmné dávky s cílem snížit produkční zatížení dojnic. Toto opatření vede k posílení obranyschopnosti zvířat, omezení vylučování *S. aureus* a k poklesu buněčných elementů v bazénovém vzorku skupiny.



# System depistáže dojnic vylučujících mlékem kvasinky

## Co je candida a proč se nedá léčit jako ostatní mastitidy ?

- Jednobuněčný eukariotický organismus, s plísněmi patří do říše hub.
- Rod Candida má 19 druhů. U krav *C.rugosa*, *C.krusei*, *C.albigans*.
- Na povrchu těla, trávicím traktu a v mléce bývá v rovnováze s bakteriemi (komezálové).
- Způsobuje 2 – 10% mastitid, obvykle sezónní, vícedruhová etiologie.



**Candida rugosa**

Na PM testu roste  
na G- sektoru v podobě  
průhledných bezbarvých  
kolonií  
Neléčí se ATB

# Jak dojde v chovu k nárůstu počtu mastitid vyvolaných kvasinkami ?

letní období, vysoké teploty, vyšší infekční tlak, stres



vzestup PCB, výběr „milionářek“,  
přeléčení širokospektrálními ATB



eliminace bakteriální flory vemene  
prostor pro přemnožení kvasinek

**enormní vzestup PCB v bazénových vzorcích, mléko neprodejně**

# Jak léčit mastitidy způsobené *Candida rugosa*

- Zoohygiena - snížení tepelného stresu, úprava podestýlky, nevyhazovat zbytky krmení pod krávy, dezinfekce při aplikaci intramamárních preparátů
- Pomocí PM testu odhalit původce mastitidy
- Bakteriální mastitidy přeléčit dle protokolu ATB léčby
- Dojnice s příznaky zánětu ( NK test ) vylučující mlékem kvasinky rodu *Candida* shromáždit do skupiny a té zajistit vyšší četnost dojení (4x až 6x denně). Léčbu je vhodné podpořit intramamárními preparáty bez obsahu antibiotik .V literatuře uváděnou specifickou terapii založenou na intramamární aplikaci polymyxinu B, případně syntetických derivátů imidazolu (nystatin, natamycin, klotrimazol) nelze vzhledem ke stávající legislativě doporučit.

# Streptococcus uberis

## původce rekurentních mastitid

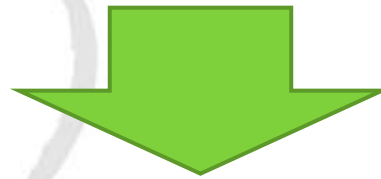
- Po utlumení *Streptococcus agalactiae* a *Staphylococcus aureus* v chovu je *Streptococcus uberis* nejčastější původce mastitid.
- Plíživý rozvoj mastitidy, komplikovaná terapie a časté reinfekce .
- Schopnost postupně napadat čtvrti mléčné žlázy jednu po druhé, často souběžná infekce různého stadia ve více čtvrtích.
- V minulosti *Streptococcus uberis* řazen k environmentálním původcům převážně chronických mastitid.
- Současný náhled - více kmenů *S. uberis*, odlišujeme nový druh *Streptococcus parauberis* , liší se agresivitou a rezistencí vůči ATB, schopností destruovat tkáň vemene .

# Jak dojde v chovu k nárůstu počtu mastitid způsobených *Streptococcus uberis* ?

Souběh faktorů vedoucích k nárůstu počtu mastitid (stres, pokles imunity, nedostatečná zoohygiena)



Depistáž původců mastitid a stanovení „jednotné“ ATB léčby dle nejzávažnějšího patogena



Aplikace nového protokolu léčby, původní dominantní patogeny ustupují, *S. uberis* přežívá a šíří se

**Vysoký počet „vracejících se“ mastitid**

# System stanovení správného protokolu léčby u rekurentních mastitid

## Streptococcus uberis

Na PM testu roste na STR  
sektoru v koloniích  
tmavěmodré barvy  
Obvyklá intramamární  
terapie se 3 aplikacemi  
selhává

Úspěšná je 6 – 8 denní  
kombinovaná aplikace  
synergických ATB



# System stanovení správného protokolu léčby u rekurentních mastitid

## Streptococcus parauberis

Na PM testu roste na STR  
sektoru v koloniích  
růžovofialové barvy

V terapii volíme 6 – 8 denní  
aplikaci ATB

Antibiogram bývá  
komplikovanější než u *S.uberis*,  
nutné je stanovení MIC



# System stanovení správného protokolu léčby u rekurentních mastitid

1. Nastavení metodiky protokolu dojení na vyšší citlivost rozpoznávání mastitid. Často je *S.uberis* zachycen při akutním vzplanutí mastitidy způsobeném jiným patogenem. V jednom vzorku mléka je potom záchyt dvou patogenů (každý má svoji niku ve čtvrti). Infekce *S.uberis* se rozvíjí pozvolna (týdny!), na zachycení jemných vloček v mléce je třeba rutinně používat odstřikovací nádoby s černým dnem, pracovat s NK testem i daty z KU.
2. Mléko podezřelých krav kultivujeme na PM testu .
3. Na dojnice vylučující mlékem *S. uberis* aplikujeme zvláštní protokol léčby (speciální IMM ATB po dobu 8 dnů, nebo kombinovaná ATB léčba, citlivost, MIC, častá kontrola účinnosti in vivo). Ostatní původce mastitid určené PM testem léčíme obvyklým způsobem IMM preparáty (zásady správného užití ATB, ekonomické důvody)



# Diagnostika a hodnocení mastitid vyvolaných koagulázanegativními stafylokoky

- Rod *Staphylococcus* má cca 50 druhů, cca 10 KPS a 40 KNS
- Většina druhů je nepatogenní a tvoří součást přirozené mikroflóry kůže a sliznic člověka i zvířat, vyskytují se také v půdě nebo v potravinách
- Koagulázanegativní stafylokoky u krav nacházíme v ragádách (prasklinách, poraněních na hrotech struků, vzniklých nesprávnou funkcí dojírny)
- U skotu 12 druhů KNS, 4 z nich potenciální patogeny (*Staphylococcus chromogenes*, *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. sciuri*)
- V případě nedostatečné bariéry strukového kanálku pasážují do mléčné cisterny, kde se pomnoží a napadají sliznice mlékovodů

# Příčiny nárůstu mastitid *Staphylococcus chromogenes* na úrovni stáda dojnic

Účinný antimastitidní program

Zvládnutí kontagiózních  
patogenů



Prostor pro environmentální patogeny

Bezstelivové provozy  
Rošty  
Poškození hrotů struků



Vysoký počet mastitid způsobených *S. chromogenes*

# Diagnostika a hodnocení mastitid vyvolaných koaguláza negativními stafylokoky

## Staphylococcus chromogenes

Na PM testu roste na STA sektoru v podobě bílých kolonií

Nejčastější a nejzávažnější z potenciálně patogenních KNS

Léčba intramamární, vysoce úspěšná



# Diagnostika a hodnocení mastitid vyvolaných koaguláza negativními stafylokoky

1. Pomocí PM testu rozlišit KNS na farmě - nezbytná prvotní depistáž a ověření výsledků na Maldi-tofu pro určení druhového spektra KNS
2. Je nutný pečlivý odběr vzorku mléka. Musíme řádně (5 x až 10x) odstříknout, případně zvážit odběr vzorku ze zbytkového mléka po ukončení dojení.
3. PM test nám různým zbarvením kolonií KNS umožní odlišit původce mastitidy ve vzorku mléka (vysoká četnost kolonií jednoho druhu) od KNS kontaminujících vzorek během odběru při propláchnutí ragád na konci struku (směs různých KNS).
4. Terapii antibiotiky zahájíme po korelaci vzestupu PCB a pozitivním nálezem *Staphylococcus chromogenes* z PM testu

# DIFERENCOVANÉ ZAPRAHOVÁNÍ KRAV

Cíle:

- A. Úspora nákladů na léčiva rozdělením zaprahovaných dojnic do skupin dle závažnosti nálezu z vyšetření PM testem a následným diferencovaným ošetřením DC preparáty
- B. Cílené použití antibiotik na konkrétního původce zánětu mléčné žlázy
- C. Použití antibiotik s indikačním omezením jen v nezbytných případech

# Postup zavedení programu diferencovaného zaprahování krav na farmě

- Depistáž spektra původců mastitid
- Ověření výsledků na Maldi-tofu
- Stanovení citlivosti na antibiotika in vitro
- Kontrola účinnosti in vivo
- Diagnostika pomocí PM testu – správný odběr vzorků, využíváme směsné vzorky od každé dojnice
- Evidence nálezů, terapie a reinfekcí po porodu

# Protokol léčby dojnic dle závažnosti nálezu na PM testu

- A. PM test bez nálezu patogenů vylučovaných mlékem :
- aplikace bariérové uzávěry bez ATB (struková zátka)
  - doporučeno jen u chovů, které mají nálezy B. a C. do 20%
- B. PM test s nárůstem kolonií méně závažných původců mastitid :
- aplikován běžný DC preparát s obsahem ATB (citlivost in vitro), následně kanálek uzavřen strukovou zátkou
- C. PM test s nárůstem kolonií kontagiózních původců mastitid:
- terapie v souladu s cíleným antimastitidním programem farmy, aplikace ATB parenterálně, intramamárně ATB synergní DC preparát (kvalitní nosič ATB - OL min. 45dnů), struková zátka

# Závěrem...

- Odlišnost mastitid je daná nejen klinickým rozlišením, ale musíme zohlednit i přítomnost a druh etiologického agens
- Každý patogen mléčné žlázy má svoji strategii, jak čtvrt' infikovat, jak se bránit obranným reakcím imunitního systému dojnice, jak přežít útok terapeutik a jak se dál šířit.
- Z odborného a ekonomického hlediska není správné v chovu mléčného skotu hledat univerzální antibiotikum na všechny mastitidy, preferujeme zavedení více protokolů léčby, používání jednodruhových ATB, antibiotika s indikačním omezením aplikujeme jen v odůvodněných případech
- PM test barevně odliší více než 20 druhů patogenů mléčné žlázy. Druhovú diagnostiku původce mastitidy nám umožňuje minimalizovat náklady na léčbu při vlastní ceně PM testu 75 Kč



Děkuji za pozornost ...

