

# LAMGEN 2013

## Boj proti mastitidám pomocí DNA testů

### Laboratoř agrogenomiky MENDELU

Připravila Ing. Vrtková pro setkání členů a příznivců CHD Impuls 20.11.2013 Pivovar Dalešice  
a setkání chovatelů českého strakatého skotu 3. – 4. 12. 2013 Skalský Dvůr

Navzdory úsilí v prevenci a různých kontrolách např. počtem somatických buněk je mastitida stále nejdražší nemocí v produkci mléka.

Celosvětově publikované odhady ekonomických ztrát klinické mastitidy jsou v rozmezí od 61 do 97 € na krávu s velkými rozdíly mezi farmami. Např. v Nizozemsku, ztráty z klinické a subklinické mastitidy, uvádějí od 17 do 198 € za krávu ročně. Finové odhadují ztrátu při klinické mastitidě ve vrcholu laktace na 950 €.

Proto zkuste bránit svoje chovy sledováním mastitidních patogenů ve vzorcích mléka z tanků a využijte k tomu DNA testy.

#### Co na to říká kráva:

Mám či nemám mastitidní patogeny?  
Do vemene si nevidím

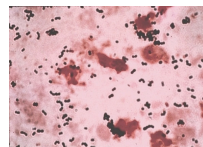
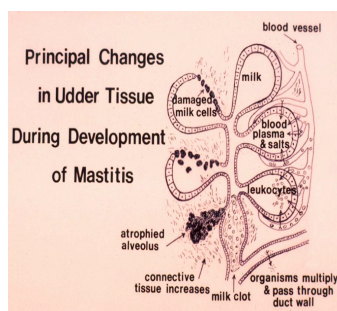
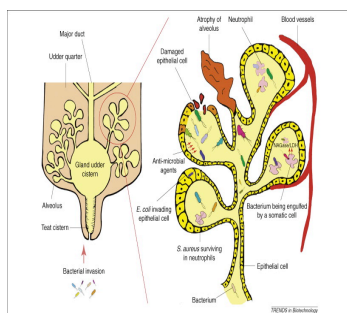


a bakterie jsou malé

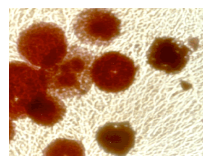


*S. aureus*

Ve vemeni to vypadá takto:



*S. agalactiae*



*Mycoplasma bovis*

**Jak poznám, že je tam mám?**

**Dám trochu mléka na DNA analýzu pro Laboratoř agrogenomiky Mendelu**

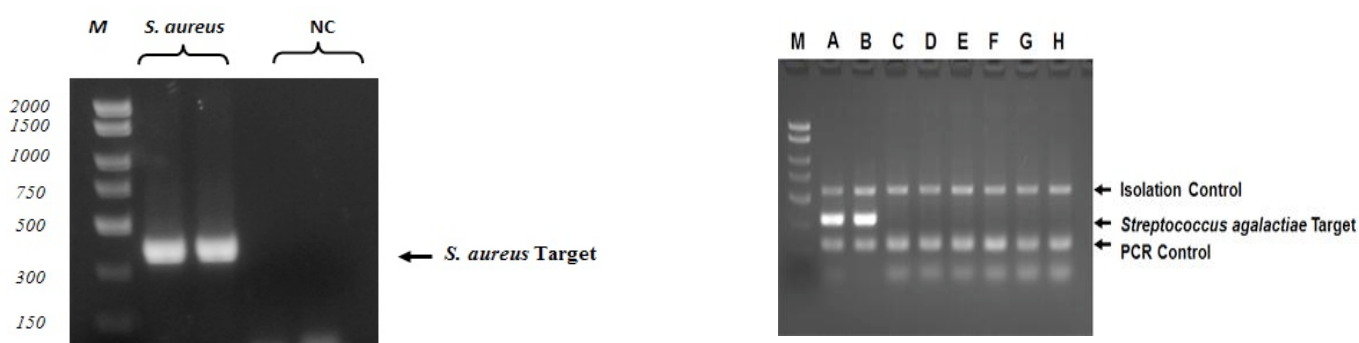
## Jak poznají DNA testem, že mám v mléce mastitidní patogeny a kolik jich tam je ?

Vrtková z LAG říká, že udělají PCR nebo real time PCR a do 24 hodin už to ví!

Zkratka PCR je tzv. polymerázová řetězová reakce, při níž se mnohokrát zmnoží určitá část DNA ze sledované bakterie. Když je dost stejných kousků DNA, dá se to na „plotnu“ z agarozového gelu, na opačné konce plotny se připojí jeden pól stejnosměrného proudu. Stejně kousky DNA mají stejnou velikost, náboj atd. a proto putují v sítu gelu stejnou rychlostí. Z každého druhu bakterií se berou různě velké kousky a proto se od sebe oddělí.

## Jak vidí z malých bakterií ještě menší kousky DNA, když nepoužívají žádný velký mikroskop?

Po této elektroforéze se gel prosvítí UV světlem a tam, kde je DNA dané bakterie, je vidět svítící proužek. To je důkaz přítomnosti bakterie – patogenu (živého i mrtvého), ale neví, jaké množství jich ve sledovaném mléce je. Viz obrázky gelů s proužky DNA pro nakažlivé mastitidní patogeny: *S. aureus* a *S. agalactiae*.

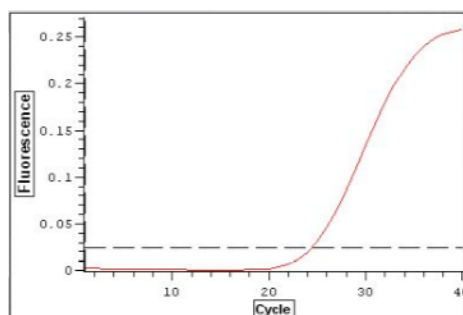


Na obou gelech na levém okraji jsou proužky standardu pro velikosti „kousků“ DNA. Jejich velikost se udává počtem párů bází v molekule DNA. Báze jsou celkem jen čtyři. Ty se spojují do párů podle genetické zákonitosti. Báze A se spojí pouze s bazí T a báze C má v opozici pouze bázi G. Pokud se spojí jinak, je to v genetice tzv. mutace. V české politické scéně je to zřejmě úplně jedno, s kým se kdo spojí, nebo jak se při hlasování tzv. „vypárují“.

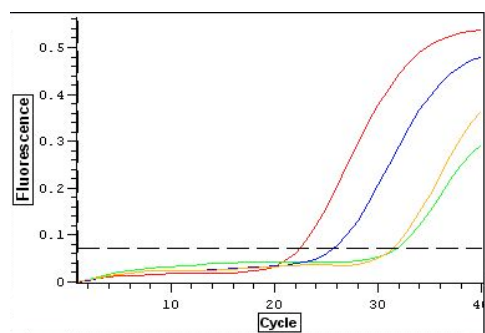
Pro posouzení množství mikroorganismů (kvalifikovaný odhad) mají v LAG složitější metodu, tzv. real-time PCR. (RTPCR).

Při RTPCR vidí na monitoru počítače křivku, jak rychle se množí – narůstá množství DNA (z živých i mrtvých bakterií) a podle vyhodnocujícího programu vyjadřují množství patogenu počtem křížků (v parlamentu, před hlasováním, se kladné hlasy odhadují z počtu („stálých nebo přeběhlých“) poslanců).

Na dalších obrázcích jsou křivky z RTPCR



*S. aureus*



Multiplex: *S. aureus*, *S. agalactiae*, *M. bovis*

## Příklady z DNA testů – ze zahraničí i Česka

### 1. Jaké DNA testy používají pro kontrolu mléka v tancích a které nakažlivé patogeny nacházejí?

Podle publikovaných informací v časopisech v mnoha zemích EU a v zámoří ověřují především multiplexy PCR a RTPCR a další sofistikovanější metody, jako MALDI-TOF a další nové techniky.

Z rozsáhlejších prací, které byly v roce 2012 a 2013 provedené, jsou údaje o nakažlivých patogenech v následující tabulce.

#### Výsledky detekce nakažlivých patogenů v tancích pomocí PCR v různých zemích

Země	počet tanků	celkem počet krav	počet tanků s výskytem patogenů		
			S. aureus	S.agalactiae	M. bovis
Kanada	117	6500	99	10	4
Dánsko	4258	--	--	305	--
Norsko	435	--	--	15	--
Austrálie	42	--	14	--	--
Česko 2013	20	5500	6	1	1

-- znamená, že daný patogen autoři v publikaci neuvádí

V pilotním průzkumu v rámci projektu MZe č. QJ1210301 se sledovaly z tanků multiplexem RTPCR v LAGu i enviromentální patogeny. Ve zkrácené formě uvádíme sestupně – v % jejich výskyt : CoNS-85, SUB-75, APY-55, SDG-50, KLEB-35, CBO-10, ECO-5, ENT-5, SMAR-0.

### 2. Evidují někde výskyt mastitidních mikroorganismů?

V některých zemích vedou centrální evidenci výskytu patogenů. Např. ve Finsku evidovali za tři roky 77051 záznamů o výskytu patogenů v mléce od krav s klinickou a subklinickou mastitidou s nejčastějším výskytem Staphylococcus aureus (18,26% a 17,73%). Upozorňují na velké regionální a sezonní diference.

V Dánsku je podle informace autorů Cederlöf a kol. uveřejněné v listopadu minulého roku od července 2010 dovoleno nahradit bakteriální kultivaci pro mikrobiologickou diagnostiku určením patogenů metodou DNA – PCR.

**V roce 2012 bylo PCR testování hlášeno ze 767 dánských farem.** Farmáři si mohou PCR testy objednat. Vycházejí prvotně z klasického údaje o počtu somatických buněk. Do jednoho týdne odeberou vzorky, které jsou analyzovány pomocí RTPCR. Výsledky zasílají farmáři do “Danish Cattle Databáze“, která výsledky PCR testů registruje.

Poznámka: Jistě Vás zajímají i komerční ceny testů. V cizině např. jedna z laboratoří skupiny „Van Haeringen Group“, zahrnující VHL v Nizozemí, VHP v Belgii a Certagen GmbH v Německu nabízí multiplex DNA test za 32,5 Eura bez DPH.

**VŠEM CHOVATELŮM ČESKÉHO STRAKATÉHO SKOTU,**  
kteří zareagovali na náš dopis (na 85 dopisů přišlo 34 odpovědí), a povolili získávat vzorky mléka od svých krav z LRM, pro molekulárně genetickou část projektu s názvem: "Výzkum, nové produkty a služby pro vytvoření centra prevence, detekce a podpory léčby mastitid"  
**DĚKUJEME**

Pracovní skupince Laboratoře AgroGenomiky (LAG) na Mendelu jste tak umožnili dělat výzkum a nemusí získávat vzorky podobnými způsoby, jako jsou na obrázcích :



Jsme rádi, že máte zájem o výzkum, ale odezva na naše dopisy byla menší než např. v Kanadě. Univerzita v Qubecu oslovila celkem 125 chovatelů a z nich 117 souhlasilo s účastí ve sledování mastitidních patogenů.

### **Co budeme ve vzorcích mléka z cisteren (tanků) sledovat**

V první fázi se zaměřujeme na detekci DNA nakažlivých patogenů tj.:  
Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae a Mycoplasma bovis

#### **Proč**

Máme k dispozici multiplex DNA test – RTPCR pro společnou detekci všech tří uvedených bakterií. Určovat je můžeme i z mléka zmrazeného nebo konzervovaného např. bronopolem, který se používá ve vzorcích pro KU.

Pokud ve vzorcích některý z patogenů zjistíme ve větším množství, co nejdříve Vás budeme informovat.

Budeme s Vámi konzultovat např. možnost určení i dalších, tzv. enviromentálních mikroorganismů. Celkem jich můžeme stanovit 11. Např.: u Vámi vybraných krav si můžete při KU odebrat do zkumavky mléko, zamrazit a poslat poštou do LAG. V rámci možnosti projektu provedeme pro Vás DNA test.

Kdo vede výzkum na Mendelu:

Vrtková

**Laboratoř agrogenomiky**

**irenav@mendelu.cz**

**+420 607 753 219**

**www.lamgen.cz**