

PathoProof™ Mastitis PCR Assay ODKRIVANJE MIKROBNIH POVZROČITELJEV MASTITISA S TEHNOLOGIJO PCR

PathoProof™ Complete-16 je test, namenjen odkrivanju mikrobnih povzročiteljev mastitisa v vzorcih kravjega mleka. Metoda temelji na verižni reakciji s polimerazo v realnem času (real-time PCR) in omogoča identifikacijo 15 najpogostejših povzročiteljev mastitisa ter prisotnost β -laktamaznega gena, odgovornega za penicilinsko rezistenco.

Prednosti metode:

- točnost in zanesljivost rezultatov,
- hitra diagnostika brez gojenja mikroorganizmov- od vzorca do rezultatov v samo 4 urah,
- možnost analiziranja konzerviranih in zamrznjenih vzorcev.

S kitom Complete-16 lahko identificiramo:

- *Staphylococcus aureus*,
- *Staphylococcus* spp. (vključno s *S. aureus* in pomembnimi koagulaza-negativnimi stafilokoki),
- *Streptococcus agalactiae*,
- *Streptococcus dysgalactiae*,
- *Streptococcus uberis*,
- *Escherichia coli*,
- *Enterococcus* spp. (vključno z *E. faecalis* in *E. faecium*),
- *Klebsiella oxytoca* in/ali *Klebsiella pneumoniae*,
- *Serratia marcescens*,
- *Corynebacterium bovis*,
- *Truperella pyogenes* in/ali *Peptoniphilus indolicus*,
- *Mycoplasma bovis*,
- *Mycoplasma* spp.,
- kvasovke,
- *Prototheca* spp.,
- β -laktamazni gen.

Vzorčenje in izvedba analiz

Za vzorčenje mleka poskrbi lastnik živali, ki lahko vzorce odvzame sam ali v sodelovanju z veterinarjem. Rezultati analize pokažejo realno mikrobiološko sliko v vimenu le, kadar je med vzorčenjem poskrbljeno za ustrezno higieno in je vzorec pravilno odvzet:

- vime pred odvzemom vzorca umijemo in razkužimo,
- odstranimo prve curke mleka,
- vzorčimo v sterilno embalažo (na voljo v laboratoriju).

Minimalna zahtevana količina vzorca je 30 mL. Lastnik živali lahko vzorce v laboratorij dostavi osebno ali pa jih odda vzorčevalcem in dovoznim šoferjem na zbiralnicah mleka (v kolikor mleko oddaja v Mlekarno Celeia). Zaradi organizacije sprejema vzorcev in izvedbe analiz je zaželen predhodni dogovor z laboratorijem. Vzorce mora spremljati zapisnik s podatki o lastniku živali in identifikaciji vzorca ter kontaktnimi podatki za obveščanje o rezultatih (naslov, elektronski naslov, tel. številka,...).

V laboratoriju vsakemu vzorcu najprej izmerimo število somatskih celic, saj je ta podatek poleg identificiranega povzročitelja mastitisa zelo pomemben pri interpretaciji rezultatov. Kadar se mastitis pojavi pri posamezni kravi, je priporočljivo, da se odvzamejo štirje ločeni vzorci mleka po četrtih. Število somatskih celic se v tem primeru ugotavlja na vseh štirih četrtih, identifikacija povzročitelja mastitisa (analiza qPCR) pa je nato izvedena le na vzorcu tiste četrti, kjer je število somatskih celic povišano.

Podajanje rezultatov analiz

Rezultati analize so podani semikvantitativno:

- - (mikroorganizem v vzorcu ni bil zaznan),
- + (v vzorcu je bila zaznana manjša količina mikroorganizma),
- ++ (v vzorcu je bila zaznana večja količina mikroorganizma),
- +++ (v vzorcu je bila zaznana izjemno velika količina mikroorganizma).

Kadar je v vzorcu zaznanih več različnih mikroorganizmov in eden izmed njih prevladuje v več kot 90 %, je poleg rezultata podan tudi odstotek:

- >90 % (mikroorganizem v vzorcu prevladuje v več kot 90 %),
- >99 % (mikroorganizem v vzorcu prevladuje v več kot 99 %)

Interpretacija rezultatov

Rezultati analize odražajo dejansko stanje v vimenu le, kadar je bil vzorec mleka pravilno odvzet. V primeru, da med vzorčenjem ni bilo poskrbljeno za zadostno higieno (umivanje in razkuževanje vimena, odstranitev prvih curkov, vzorčenje v sterilno embalažo,...), obstaja velika verjetnost, da je prišlo do kontaminacije in se v vzorcu mleka nahajajo tudi mikroorganizmi iz okolja in kože živali, ki so nato napačno prepoznani kot prisotni povzročitelji mastitisa.

Kadar je nek mikroorganizem prisoten v vzorcu mleka, je njegov rezultat podan kot +, ++ ali +++. Kit Complete-16 v vzorcu zazna tako vrsto *Staphylococcus aureus* kot tudi druge vrste rodu *Staphylococcus*, vključno z *S. aureus*, zato v tem primeru rezultate interpretiramo takole:

- Kadar je rezultat za *Staphylococcus* spp. pozitiven in rezultat za *S. aureus* negativen, pomeni, da so v vzorcu prisotne vrste rodu *Staphylococcus*, vendar brez *S. aureus*.
- Kadar je rezultat za *Staphylococcus* spp. negativen in rezultat za *S. aureus* pozitiven, pomeni, da je v vzorcu prisoten samo *S. aureus*, brez ostalih vrst stafilokokov.
- Kadar sta rezultata pozitivna tako za *Staphylococcus* spp. kot tudi za *S. aureus*, pomeni, da so v vzorcu poleg vrste *S. aureus* prisotne tudi druge vrste rodu *Staphylococcus*.

Po enakem principu poteka interpretacija rezultatov za vrsto *Mycoplasma bovis* in rod *Mycoplasma* spp. (druge vrste mikoplazem).

V povezavi s prisotnostjo *S. aureus* in *Staphylococcus* spp. se v vzorcih ugotavlja tudi prisotnost β -laktamaznega gena, odgovornega za penicilinsko rezistenco. Rezultate interpretiramo takole:

- Kadar je rezultat za *S. aureus* in/ali *Staphylococcus* spp. pozitiven in rezultat za β -laktamazni gen negativen, pomeni, da identificirani stafilokoki niso odporni proti penicilinu.
- Kadar je rezultat za *S. aureus* in/ali *Staphylococcus* spp. pozitiven in rezultat za β -laktamazni gen ravno tako pozitiven, pomeni, da so identificirani stafilokoki odporni proti penicilinu.

Obveščanje o rezultatih in zdravljenju

Obveščanje o rezultatih analiz poteka po navadni pošti, elektronski pošti ali po telefonu. Na željo naročnika/lastnika živali o rezultatih analiz obvestimo tudi hišnega oz. lokalnega veterinarja, kateremu smo na voljo tudi za izmenjavo izkušenj, mnenj in drugo svetovanje v zvezi z interpretacijo rezultatov in priporočenimi ukrepi.

Na odločitev o morebitnih ukrepih poleg znanega povzročitelja mastitisa vplivajo še številni drugi dejavniki, kot so število somatskih celic, klinični simptomi okužbe, starost živali in njeno preteklo zdravstveno stanje, zdravstveno stanje celotne črede itd. **Odločitev o smiselnosti in načinu zdravljenja lahko na podlagi vseh razpoložljivih podatkov sprejme izključno veterinar.**