



Detekcja mastitis cz 1.

Łukasz Kaczorowski¹, Paweł Cyplik², Jakub Czarny¹

¹Institut Genetyki Sądowej w Bydgoszczy,
Aleje Adama Mickiewicza 3/3-5, 85-071 Bydgoszcz

²Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań
pawel.cyplik@up.poznan.pl

Najistotniejszą z chorób bydła mlecznego jest zapalenie wymienia, nazywane także mastitis (1). Mastitis definiuje się jako zapalenie sutka charakteryzujące się zmianami właściwości fizycznych, chemicznych lub mikrobiologicznych mleka oraz patologicznymi zmianami w tkance gruczołowej w wyniku odpowiedzi zapalnej organizmu na czynnik zewnętrzny powodujący uszkodzenie tkanki (2). Główną przyczyną zapalenia jest infekcja bakteryjna (3). Do pozostałych powodów wywołania choroby należą infekcje innymi drobnoustrojami (algi, grzyby, drożdżaki, mikoplazmy) oraz uszkodzenia mechaniczne wymienia (4). Ze względu na etiologię zakażenia mastitis można podzielić na dwie podstawowe kategorie: mastitis zakaźne oraz środowiskowe. Najpopularniejszą, najłatwiejszą, najprostszą i prawdopodobnie najtańszą metodą wykrywania mastitis jest określenie liczby komórek somatycznych. Komórki somatyczne (leukocyty i komórki nabłonkowe) w ograniczonym stopniu przenikają do mleka. W przypadku infekcji wymienia ich liczba znacząco wzrasta. Tą zależność wykorzystano do diagnostyki mastitis. Podaje się różną liczbę LKS jako wartość progową dla mastitis, ale najczęściej przyjmują się $LKS \geq 200\ 000$ komórek/ml mleka (5). Nie zawsze wartość poniżej tego progu oznacza brak infekcji, ponieważ dla niektórych patogenów średnie LKS oznaczano także poniżej tej wartości (6). Testy oznaczające LKS można podzielić na pośrednie i bezpośrednie (5). Przykładem testu pośredniego jest test kalifornijski (California Mastitis Test – CMT). Test ten polega na podaniu na specjalną tackę z 4 dołkami około 2 ml mleka (jedna ćwiartka = jeden dołek), a następnie dodaniu tej samej objętości odczynnika (alkilarylosulfonianu). Odczynnik powoduje rozpad błon komórkowych LKS uwalniając białka i DNA, które jednocześnie ulegają precypitacji powodując gęstnienie i żelowanie roztworu w stopniu wprost proporcjonalnym do wyjściowej liczby LKS. Wynik odczytuje się po około 10 sekundach i ocenia się w skali od 1 do 5 (lub N – ujemny, T – śladowy, +, ++, +++), gdzie 1 – brak gęstnienia, osadu, żelowania ($LKS < 200\ 000$); 5 – całkowite zgęstnienie i żelowanie, z uwypukleniem na środku, w formie jajka sadzonego ($LKS > 5\ 000\ 000$) (7, 8, 9). Występują znaczne rozbieżności co do przydatności testu CMT w codziennym screeningu bydła mlecznego. Dla głównych patogenów mastitis oszacowano czułość i specyficzność testu CMT na odpowiednio, 82,4% oraz 80,6% dla 4 dnia laktacji (10). Z kolei dla krów w fazie zasuszenia czułość testu CMT oceniono na 70%, a specyficzność jedynie na 48% (11). Ocenia się też wyższą czułość dla zakażeń wywołanych przez główne patogeny mastitis (*S. aureus*, *S. agalactiae*) niż dla innych patogenów (12). Mimo wymienionych wad test CMT jest tani, szybki i może być wykonany na miejscu, dlatego też może służyć jako forma badań przesiewowych dla krów mlecznych w stadzie (11).



Inną pośrednią metodą oceny LKS jest Wisconsin Mastitis Test (WMT). Test w założeniach jest bardzo podobny do testu CMT (ta sama reakcja z tym samym odczynnikiem), jednak przeprowadza się go w inny sposób – laboratoryjny, w celu uzyskania bardziej precyzyjnych i powtarzalnych wyników. Odpowiednią ilość mleka wlewa się do probówek, następnie dodaje odczynnik i po dokładnym wymieszaniu próbówki odwraca się, aby umożliwić wypływ mleka z odczynnikiem. Następnie próbówki odwraca się z powrotem i po minucie odczytuje się wysokość słupa cieczy pozostałej w probówce w mm. Podobnie jak w przypadku testu CMT zależność jest wprost proporcjonalna (im wyższy poziom pozostałej cieczy tym wyższy poziom LKS). Dzięki dokładnemu odmierzeniu dodawanego mleka i odczynnika oraz kontroli temperatury, metoda jest bardziej znormalizowana, a wyniki bardziej powtarzalne. Wadą jest brak możliwości wykonania testu w miejscu pobrania próbki ze względu na jego laboratoryjny charakter (13). Metody bezpośrednie polegają na zliczaniu komórek. Odbywa się to przez użycie przenośnych urządzeń do zliczania komórek somatycznych lub automatycznych aparatów laboratoryjnych (5). Powstało wiele przenośnych aparatów do określenia poziomu LKS. Przykładem takiego urządzenia jest licznik komórek somatycznych DeLaval. Urządzenie to używa jodku propidyny do wybarwienia jąder komórkowych komórek somatycznych, dzięki czemu umożliwia ich precyzyjne zliczenie, a cały pomiar odbywa się w czasie 1 min. Urządzenie prezentuje błąd pomiarowy oraz powtarzalność wyników wystarczającą do rutynowych badań (14, 15). Podobnie funkcjonuje także urządzenie C-Reader, które zlicza liczbę komórek, dzięki użyciu mikroskopu fluorescencyjnego i barwnika – bromku etydyny do wybarwienia DNA w jądrach komórkowych (16). Zaprojektowano także system oceny LKS z wykorzystaniem smartfonu, dzięki użyciu powiększającej soczewki do aparatu telefonu oraz zaprojektowanej do tego celu aplikacji. Wykazano zbliżoną dokładność urządzenia z innymi systemami na rynku, a dodatkowo koszt takiego rozwiązania jest bardzo niski – około 20 dolarów (17).

Bardziej dokładnymi urządzeniami do liczenia LKS są aparaty laboratoryjne, np. cytometr przepływowy, mikroskop fluorescencyjny. Cytometr przepływowy jest od lat z powodzeniem stosowany do zliczania komórek i grupowania ich na poszczególne frakcje dzięki różnicom w ich morfologii (18). Szybko też znalazł zastosowanie w diagnostyce mastitis poprzez określanie liczby LKS. Cytometr charakteryzuje się bardzo dużą dokładnością i precyzją, jednak urządzenie to jest bardzo drogie, a do jego obsługi wymagany jest przeszkolony personel (19). Mikroskopia fluorescencyjna jest przydatną i od dawna stosowaną technologią w ocenie LKS. Metoda jest dokładna, lecz przygotowanie próbki jest pracochłonne i wymaga dużego doświadczenia, dlatego też może być wykonane jedynie w laboratorium przez doświadczony personel (20, 21). Nowoczesne techniki oceny LKS umożliwiają nie tylko liczenie komórek, ale także określenie liczby poszczególnych frakcji komórek, np. metoda Foss DSCC wykorzystująca połączenie cytometrii, mikroskopii fluorescencyjnej i barwienia komórek w celu, poza określeniem poziomu LKS, procentowego określenia zawartości limfocytów oraz granulocytów obojętnochnych, co umożliwia lepszą weryfikację kondycji wymienia danego osobnika (22, 23, 24).



Mastitis zwiększa aktywność ponad 20 enzymów. Tą właściwość wykorzystano w diagnostyce tej choroby. Esteraza leukocytarna znajdująca się w leukocytach została pierwotnie zaimplementowana do wykrywania leukocytów w moczu, jednak szybko wykorzystano ją w wielu innych płynach ustrojowych. Do diagnostyki mastitis wykorzystano fakt znaczącego zwiększenia LKS podczas choroby, głównie z powodu leukocytów, dlatego też aktywność esterazy zwiększa się wprost proporcjonalnie do wzrostu LKS. Komercyjne testy na esterazę dostępne są w formie testu paskowego na którym znajdują się związek chemiczny – substrat dla esterazy. Po uwolnieniu esterazy z komórek, dzięki użyciu detergentu, następuje przetwarzanie substratu do produktu przez enzym. Reakcji tej towarzyszy wytwarzanie barwnika o intensywności korelującej z ilością enzymu, dlatego metodę można zakwalifikować jako półilościową. Metoda ta nie jest zbyt czuła, ale charakteryzuje się łatwą dostępnością, niskim kosztem, łatwością użycia bez konieczności posiadania sprzętu oraz szybkością wykonania (25, 26).

Od wielu lat do wykrywania mastitis wykorzystuje się przewodność elektryczną mleka. U krowy chorej na zapalenie wymienia zainfekowane komórki ulegają uszkodzeniu uwalniając sód i chlor, w ten sposób zwiększając przewodność mleka. Mimo prostoty metody w założeniach, przewodność elektryczna mleka jest zależna (poza mastitis) od wieku krowy, jej rasy, liczby przebytych laktacji, fazy laktacji, a nawet poszczególnej ćwiartki. Jedną z największych zalet tej metody jest możliwość zastosowania jej w dojarkach, a zatem jej automatyzacja, co znacząco skraca pracę i wysiłek hodowcy włożony w przeprowadzenie testu. Wadą oceny przewodności elektrycznej mleka jest jej niska wartość diagnostyczna (czułość), mogąca dawać wiele wyników fałszywie dodatnich (27, 28).

Inne testy biochemiczne polegają na wykrywaniu zwiększonego stężenia tzw. białek ostrej fazy, m.in.: haptoglobiny oraz surowiczego amyloidu A. Stężenie tych białek rośnie podczas infekcji bakteryjnych lub wirusowych, dlatego mogą być indykatorami procesów zapalnych wywołanych przez patogeny. Wykonano wiele doświadczeń potwierdzających dodatnią korelację pomiędzy stężeniem ww. białek a ciężkością zapalenia wymienia. Metody te jednak nie są zbyt popularne. Ich wadami są przede wszystkim: brak szybkich i prostych testów, duży rozrzut wartości, a także niska wartość diagnostyczna dla podklinicznego typu mastitis (29, 30).

Literatura

1. Bradley, A. J. (2002) „Bovine mastitis: An evolving disease”, *Veterinary Journal*, 164(2), ss. 116–128. doi: 10.1053/tvj.2002.0724.
2. Kibebew, K. (2017) „Bovine Mastitis: A Review of Causes and Epidemiological Point of View”, *Journal Of Biology, Agriculture and Healthcare*, 7(2), ss. 1–14. Dostępne na: www.iiste.org.
3. Klaas, I. C. i Zadoks, R. N. (2018) „An update on environmental mastitis: Challenging perceptions”, *Transboundary and Emerging Diseases*, 65, ss. 166–185. doi: 10.1111/tbed.12704.
4. BeniĆ, M. i in. (2018) „Bovine mastitis: a persistent and evolving problem requiring novel approaches for its control - a review”, *Veterinarski arhiv*, 88(4), ss. 535–557. doi: 10.24099/vet.arhiv.0116.
5. Duarte, C. M., Freitas, P. P. i Bexiga, R. (2015) „Technological advances in bovine mastitis diagnosis: an overview”, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 27(6), ss. 665–672. doi: 10.1177/1040638715603087.
6. Sumon, S., Ehsan, M. i Islam, M. (2017) „Subclinical mastitis in dairy cows: somatic cell counts and associated bacteria in Mymensingh, Bangladesh”, *Journal of the Bangladesh Agricultural University*, 15(2). doi: 10.3329/jbau.v15i2.35073.
7. Barnum, D. A. i Newbould, F. H. (1961) „The Use of the California Mastitis Test for the Detection Of Bovine Mastitis.”, *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne*, 2(3), ss. 83–90.
8. González-Rodríguez, M. C. i Cármenes, P. (1996) „Evaluation of the California mastitis test as a discriminant method to detect subclinical mastitis in ewes”, *Small Ruminant Research*, 21(3), ss. 245–250. doi: 10.1016/0921-4488(95)00826-8.



9. Adkins, P. R. F. i Middleton, J. R. (2018) „Methods for Diagnosing Mastitis”, Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice, 34(3), ss. 479–491. doi: 10.1016/j.cvfa.2018.07.003.
10. Dingwell, R. T. i in. (2003) „Evaluation of the California mastitis test to detect an intramammary infection with a major pathogen in early lactation dairy cows”, Canadian Veterinary Journal, 44(5), ss. 413–416. Dostępne na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12757133>.
11. Sanford, C. J. i in. (2006) „Test characteristics from latent-class models of the California Mastitis Test”, Preventive Veterinary Medicine, 77(1–2), ss. 96–108. doi: 10.1016/j.prevetmed.2006.06.006.
12. Sargeant, J. M. i in. (2001) „Sensitivity and specificity of somatic cell count and California Mastitis Test for identifying intramammary infection in early lactation”, Journal of Dairy Science, 84(9), ss. 2018–2024. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(01)74645-0.
13. Thompson, D. I. i Postle, D. S. (1964) „The Wisconsin Mastitis Test – an Indirect Estimation of Leucocytes in Milk”, Journal of Milk and Food Technology, 27(9), ss. 271–275. doi: 10.4315/0022-2747-27.9.271.
14. Malinowski, E. i in. (2008) „Effect of storage conditions and preservation with Bronopol on somatic cell count with the DeLaval cell counter in cow milk”, Medycyna Weterynaryjna, 64(11), ss. 1299–1303.
15. Sanchez-Macias, D. i in. (2010) „The effects of storage temperature on goat milk somatic cell count using the DeLaval counter”, Tropical Animal Health and Production, 42(7), ss. 1317–1320. doi: 10.1007/s11250-010-9586-2.
16. Moon, J. S. i in. (2007) „Application of a new portable microscopic somatic cell counter with disposable plastic chip for milk analysis”, Journal of Dairy Science, 90(5), ss. 2253–2259. doi: 10.3168/jds.2006-622.
17. Zeng, Y. i in. (2018) „A low cost and portable smartphone microscopic device for cell counting”, Sensors and Actuators, A: Physical, 274, ss. 57–63. doi: 10.1016/j.sna.2018.03.009.
18. Laerum, O. D. i Farsund, T. (1981) „Clinical application of flow cytometry: A review”, Cytometry, 2(1), ss. 1–13. doi: 10.1002/cyto.990020102.
19. Li, N. i in. (2015) „Flow cytometry approach to quantify the viability of milk somatic cell counts after various physico-chemical treatments”, PLoS ONE. Zredagowane przez C. Egles, 10(12), s. e0146071. doi: 10.1371/journal.pone.0146071.
20. Unluturk, S. i Pelvan, M. (2015) „Application of Flow Cytometry and Fluorescence Techniques in Somatic Cell Analysis of Raw Milk”, International Journal of Food Processing Technology, 2(1), ss. 11–16. doi: 10.15379/2408-9826.2015.02.01.2.
21. Zajac, P. i in. (2016) „Fluorescence microscopy methods for the determination of somatic cell count in raw cow’s milk”, Veterinarni Medicina, 61(11), ss. 612–622. doi: 10.17221/222/2015-VETMED.
22. Damm, M. i in. (2017) „Differential somatic cell count—A novel method for routine mastitis screening in the frame of Dairy Herd Improvement testing programs”, Journal of Dairy Science, 100(6), ss. 4926–4940. doi: 10.3168/jds.2016-12409.
23. Halasa, T. i Kirkeby, C. (2020) „Differential Somatic Cell Count: Value for Udder Health Management”, Frontiers in Veterinary Science, 7. doi: 10.3389/fvets.2020.609055.
24. Zecconi, A., Dell’orco, F., i in. (2020) „Differential somatic cell count as a marker for changes of milk composition in cows with very low somatic cell count”, Animals, 10(4), s. 604. doi: 10.3390/ani10040604.
25. Kandeel, S. A. i in. (2017) „Clinical Utility of Two Leukocyte Esterase Reagent Strips for the Cow-Side Diagnosis of Subclinical Mastitis in Lactating Dairy Cattle”, Assiut Veterinary Medical Journal, 63(155), ss. 109–118. doi: 10.21608/avmj.2017.170972.
26. Mirzaei, A. i in. (2019) „Evaluation of leukocyte esterase test strips for rapid diagnosis of subclinical mastitis in dairy cows”, Comparative Clinical Pathology, 28(1), ss. 151–156. doi: 10.1007/s00580-018-2808-0.
27. Ruegg, P. L. i Reinemann, D. J. (2002) „Milk quality and mastitis tests”, The Bovine Practitioner, 36(1), ss. 41–54. doi: 10.21423/bovine-vol36no1p41-54.
28. Pyörälä, S. (2003) „Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis”, Veterinary Research, 34(5), ss. 565–578. doi: 10.1051/vetres:2003026.
29. Pyörälä, S. i in. (2011) „Acute phase proteins in milk in naturally acquired bovine mastitis caused by different pathogens”, Veterinary Record, 168(20), s. 535. doi: 10.1136/vr.d1120.
30. Mohammed, A. B. i in. (2017) „The application of acute phase protein as biomarkers in bovine mastitis The application of acute phase protein as biomarkers in bovine mastitis”, w Direct Research Journal of Veterinary Medicine and Animal Science.