**Mastitidy způsobené prototékami**

Nejedlá, E., Šlosárková, S.

**Původce**

* Bezbarvá, jednobuněčná, eukaryotní řasa oválného tvaru, těžce detekovatelná (1, 2, 3, 9), měří 3 – 30 µm a rozmnožuje se nepohlavně endospórami (4, 17, 20)
* Saprofytická (5, 6, 7, 9), roste aerobně, formuje šedé okrouhlé kolonie cca 1 mm v průměru podobné kvasinkám – snadno se s nimi dají zaměnit (5, 12, 17)
* Inkubace na krevním agaru, MacConkey nebo Sabouraud dextrózovém agaru, při teplotách 25 – 37°C, 48 – 72 hodin (17)
* Reprodukční cyklus je závislý na teplotě – probíhá v teplotách nad 25 °C (17)
* Patří do čeledi *Chlorellaceae* (4). Nyní známo 7 druhů rodu *Prototheca:*  *P. stagnora, P. ulmea, P. cutis, P. miyajii, P. wickerhamii, P. blaschkeae, P. zopfii* (3, 17)
* S bovinní mastitidou je nejvíce spojena *P. zopfii* (3). U ní jsou klasifikovány 2 genotypy (biotypy), genotyp 1 se vyskytuje primárně ve výkalech skotu a prasat a není patogenní, gen. 2 byl izolován z mastitidního mléka (3, 11, 12)
* *P. blaschkeae* byla rovněž prokázána jako původce bovinní mastitidy – původně byla klasifikována jako nepatogenní biotyp 3 *P. zopfii* (6, 18)
* Prototéka byla jako původce mastitidy poprvé popsána v r. 1952 (1), v r. 1964 zaznamenán první případ u člověka (kožní infekce způsobená *P. wickerhamii*) (4)
* Jako nejčastější původce prototékové mastitidy je publikována *P. zopfii* – biotyp 2. Portugalský výzkum – (6, 7), srbský výzkum (12) – stejný výsledek prý potvrzují studie z Itálie (18), Německa (13), Japonska, Polska (12, 20)
* *P. zopfii* je schopná tvořit biofilm na nerezových površích – proto je schopná přežívat a přenášet se dojícím zařízením (20)
* Prototéka je jediným známým rostlinným organismem, který může způsobit infekční onemocnění zvířat a lidí (13)

**Co způsobuje**

* Klinická a subklinická mastitida (1) která zůstává chronickou – přežívá i suchostojné období a může se projevit v následujících laktacích (2)
* Oportunistické infekce (1, 5, 6, 7, 9) – když je narušen imunitní systém – např. krávy, které už v téže laktaci prodělaly mastitidu vinou jiných původců, jsou až dvakrát náchylnější k infekci také prototékou, riziko se ještě zvýší, pokud byla dříve použita ATB (1, 20)
* Náchylnější jsou pravděpodobně krávy na začátku laktace – diagnostikované prototékové mastitidy kulminovaly ve 2. měsíci laktace (1 - data z Ontaria, Kanada), jiné studie říkají, že všechna stádia laktace a dokonce i perioda stání na sucho se zdají být srovnatelně rizikové (Kalifornie -2, Srbsko – 12, 17)
* Způsobuje také kožní infekce (4, 5)
* Zoonóza – požitím infikovaného mléka a výrobků z něj se můžeprototéka přenést i na člověka (9, 17, 18).

**Jak se projevuje**

* Hlavním rysem prototékové infekce je postupný (a drastický) pokles mléčné produkce v postižené čtvrti, protože řasa nenávratně mění a poškozuje tkáň mléčné žlázy (1, 3, 6, 12)
* Napadeny mohou být jednotlivé čtvrtě stejně jako celé vemeno (17)
* Životaschopnost buněk mléčné žlázy se významně snižuje 12 hodin (P<0,05) a 24 hodin (P<0,01) po infikování *P. zopfii* genotypu 2 (15)
* Sekret napadené mléčné žlázy může být vodovitý a obsahovat bílé vločky a hrudky (12), také může být více šedavý (17) – ale ne ve všech případech – infekce může být i asymptomatická (17)
* V počáteční fázi je počet somatických buněk (SB) v mléce obvykle beze změny (17), až později je charakteristický:
* Významně zvýšený počet SB v mléce - počet SB nad 300 000/ 1 ml, ale ne úplně ve všech případech (1), nad 400 000 (2), nad 1 000 000 (14), 4 175 244 +- 1 233 685/ 1 ml (Srbsko - 12). Další studie ukazují nárůst SB v mléce s postupující infekcí z 500 000/ 1 ml na několik milionů (17)
* Pokud je počet SB zvýšen jen minimálně, příčinou je pravděpodobně ředící efekt mléka z ostatních zdravých čtvrtí (14, 17)
* Významně vyšší počet SB byl nalezen v mléce ze čtvrtí infikovaných prototékou než z těch infikovaných bakterií *Staphylococcus aureus* (P<0,05) (12)
* Prototéka reaguje na California Mastitis test (CMT) – indikuje vysokou somatiku (1)
* Příležitostně se může prototéka rozšířit i mimo vemeno dále do těla a napadnout lymfatické uzliny (1)
* U některých zvířat se objevily i další symptomy – bolestivost a edém vemene (17)
* Jiné příznaky jako je horečka nebo snížená žravost obvykle chybí (2, 17)
* Infekce je často plíživá (pomalu nastupující) a subklinická, tedy se dá velmi obtížně včas rozeznat (1, 17)
* Klinické projevy infekce prototékouu člověka zahrnují nejčastěji enteritidu (17, 18) a kožní onemocnění (4, 15). Ve výjimečném případě byla popsána algemie původcem *P. wickerhamii* u lidského pacienta trpícího na systémový lupus (SLE), která se klinicky projevila i cholestatickou hepatitidou (10)

**Jak se přenáší**

* kontaktem otevřeného strukového kanálku s patogenem (zamořené prostředí) (1, 2, 3, 14 ad.), přičemž infekční dávka je u prototéky vyšší než u ostatních patogenů mléčné žlázy (14)
* při pastvě z kontaminovaných rostlin do trávicího traktu – jsou vylučovány výkaly (17)
* při zavlečení infekce do chovu se řasa dále snadno přenáší dojící technikou a kontaktem s výkaly (17, 20 a další)
* vstupem pro infekci řasou mohou být i otevřené ranky a odřeniny na strucích způsobené dojící technikou (17)
* Hlavními rizikovými faktory pro rozvoj prototékové mastitidy jsou špatné hygienické návyky – zejm. neadekvátní hygiena dojení a ustájení a nadměrné používání antibiotik (17 ad.)

**Výskyt**

* běžně se vyskytuje v prostředí – hlavně ve vlhku (17) - v hnoji, kanalizaci, půdě i vodě (sladké i slané) (1, 2, 4, 9)
* infekce u zvířat nejsou časté (oportunistické) (5, 6), ale zato celosvětově rozšířené (6, 20) a jejich počet v současné době kontinuálně roste (6, 7, 9, 12)
* V teplém a vlhkém venkovním prostředí se prototéce daří nejlépe a rychle se reprodukuje (1)
* U monogastrů bylo prokázáno, že prototéka může projít trávicím traktem živá, ale bez rozmnožení. Je pravděpodobné, že totéž dokáže i u telete a krávy, čímž se řasa pohodlně rozšíří po všech prostorách, kde se zvířata pohybují (1) Izolovaná byla i ve výkalech hlodavců chycených na mléčných farmách (2)
* Když je prostředí hodně zamořeno, zvyšuje se pravděpodobnost kontaktu patogenu se strukovým kanálkem a jsou-li podmínky „příznivé“, rozvine se prototéková mastitida (1)
* promořenost dojené populace skotu se udává od 4 do 40 % (2 - data z Kalifornie), ale více než 10 % podíl infikovaných v jednom stádě je jev řídký (2)
* Výzkumy ukazují, že prevalence prototékovéinfekce ve stádech dojeného skotu koreluje s hygienickými podmínkami (dojení a ustájení) a s nastavením managementu (hlavně kvalitou krmení a pitné vody) (18)

**Jak se léčí/ eliminuje**

* Kvůli jejich intraceluárnímu umístění se prototékové buňky špatně eliminují (5)
* Do mléka jsou prototékové buňky secernovány přerušovaně, takže nemusí být ve vzorcích detekovatelné a infekce tak můře být snadno přehlédnuta (5)
* *P. zopfii* může přežít v mléčné žláze během období stání na sucho a opět se uvolňovat do mléka v následující laktaci (5)
* Na rutinní terapii nereagují (9 ad.) - ATB nezabírají – řasa není bakterie (1, 7)
* Nejsou známa žádná účinná léčiva na infekce prototékou, která by 100 % fungovala *in vivo* (3, 5, 12, 14)
* Spontánní vyléčení nebylo publikováno (1, 12, 17)
* Důležitá je včasná diagnostika (což je složité) – při prvním výskytu prototékové infekce je nutno vyšetřit mléko všech krav ve stádě a vzorky brát individuálně z každé čtvrti. (17)
* Hlavní je prevence – zoohygiena prostředí a hlavně správné ošetření struků (1, 6, 7, 20) – konce struků (strukové kanálky) musí být vždy čisté a suché a to i v době stání na sucho (1), vyvážená výživa kvalitním krmivem a pravidelná mikrobiologická vyšetření mléka (17)
* Prototéka vytváří biofilmy i na hladkých površích jako je nerez, sklo, polypropylen, guma – stupeň kontaminace zařízení z těchto materiálů a nárůst biofilmu na něm přímo souvisí s frekvencí sanitace (20)
* Snížení vlhkosti prostředí by omezilo životaschopnost řasy a její schopnost reprodukce (1)
* Při již určené infekci je třeba přestat dojit postiženou čtvrť a zamezit možné kontaminaci dojící soupravy – i tím se může prototéka přenášet (1, 5, 20) Samozřejmě je potřeba zvýšit pozornost při pre- a post dipu.
* Rozhodně nekrmit mléko z prototékou zasažených čtvrtí telatům (1) – i jejich výkaly by byly infekční (20)
* Infikované mléko snižuje kvalitu celého tanku (zvýšené SB) a vzhledem k malému efektu léčení se doporučuje brakace krav, u nichž je prokázána infekce prototékou (2, 5, 12, 17)
* Brakace infikovaných krav je nutná a je to dosud nejefektivnější metoda jak infekci prototékou ve stádě dostat pod kontrolu/ eliminovat (17, 20), protože známé prostředky dokáží jen dočasně vylepšit klinický obraz, ale patogena v podmínkách *in vivo* neeliminují (20).
* *In vitro* fungoval na *Prototheca zopfii* guanidin *(netoxická dezinfekce používaná v humánní medicíně nebo např. na dezinfekci bazénů)* – a to už při nízké koncentraci 0,001 – 0,035 %. (3)
* Při *In vitro* testaci odolnosti vůči PH byla popsána kompletní inhibice růstu *P. zopfii* při pH 3 a limitovaný růst při pH 1 a 12. *P. blaschkeae* ukázala vyšší citlivost ke všem hodnotám pH vyjma pH 3, kdy vykazovala ve srovnání s *P. zopfii* mírný růst (8)
* Při *In vitro* testaci salinity byla sledována inhibice růstu kmenů *P. zopfii* i *P. blaschkeae* se zvyšující se koncentrací, přičemž *P. blaschkeae* byla vůči salinitě odolnější než *P. zopfii*  - snese až 18 % vs. 4,5 % u *P. zopfii* (8)
* Laboratorní testace teplotní citlivosti ukazuje redukci růstu *P. zopfii* a *P. blaschkeae* při všech standartních pasterizačních postupech - *P. zopfii* 75,94 – 90,47 %, *P. blaschkeae* 69,39 – 94,08 %*,* ale 100 % inhibici až při ohřevu infikovaného mléka na 100°C (čas: 1 s) (9)
* Tzn. na běžný pasterizační postup je *P. zopfii* rezistentní a mléko takto ošetřené nadále představuje pro člověka zdravotní riziko (17, 18, 20, 21). Publikovány byly případy infekce člověka *P. zopfii , P. wickerhami* i *P. blaschkeae* (20).
* Při *In vitro* testaci algicidního efektu chlornanu sodného (NaClO) a jódu (I) na 27 kmenů *P. zopfii* izolovaných z mastitidního mléka byla zjištěna účinnost těchto přípravků už při velmi nízkých koncentracích – NaClO 0,039 – 0,156 % a I 0,156 – 0,625 %. *(Pro srovnání - dle Wikipedie – 1 % roztok NaClO se používá k sanitaci hladkých povrchů před výrobou piva a vína.)* Tyto přípravky tedy mohou být doporučeny pro hygienická opatření v chovech – dezinfekci dojícího zařízení, pre a post dipping. Nicméně přítomnost organického materiálu (faeces, mléčný protein) a další environmentální faktory v provozních podmínkách mohou efektivitu těchto dezinfekčních přípravků snížit. (11)
* Při testaci tří sanitačních prostředků – kyseliny peroctové (CH3COOOH), chlornanu sodného (NaClO) a roztoku jódu (I) se jako nejúčinnější ukázala být kys. peroctová, která eliminovala 90 % inokulovaných řas po (24 hod. inkubace) už při koncentraci ≥ 0,019 g/l = MIC90 (minimální inhibiční koncentrace). MIC90 dalších dvou činidel byla pro NaClO ≥ 0,312 g/l a pro roztok I ≥ 0,625 g/l. Byla prokázána souvislost koncentrace sanitačních činidel a doby inkubace řas – čím delší byla doba inkubace, tím koncentrovanější činidla byla potřeba k jejich eliminaci. (20)
* Testování dalších tří sanitačních prostředků: roztoku jódu, kyseliny dodecylbenzensulfonové (DBSA-antimykotikum) a didecylmethylamonium chloridu (DDAC) prokázalo účinnost všech tří látek, přičemž nejvyšší byla u roztoku jódu, který měl sterilizační účinek i při ředění zásobního roztoku 1:100, zatímco u DDAC bylo třeba ředění 1:10 a DBSA 100 % fungovala pouze v neředěném stavu. (21)
* Antimykotika – *In vitro* vykazuje *P. zopfii* vnímavost vůči amfotericinu B a nystatinu. Dokonce byla zaznamenána i citlivost na některá ATB: gentamycin, kanamycin a polymyxin B, nicméně efektivita těchto agens *in vitro* nekoreluje s jejich efektivitou *in vivo.* (17)
* U lidského pacienta trpícího SLE byla infekce *P. wickerhamii* eliminovánaodstraněním zdroje nákazy a intravenózním podáním amphotericinu B (antimykotikum) (10)
* Testování fotodynamické inaktivace *(Využívá tzv. fotodynamický jev, kdy fotosenzitivní látka reaguje na expozici světlem vznikem singletového kyslíku a volných kyslíkových radikálů a dochází k následnému letálnímu poškození buňky.(19)* - *P. zopfii* byla inaktivována po 180 s ozáření (zatímco u ostatních bakteriálních mastitidních patogenů stačilo 30 nebo 120 s). Jako fotosenzitivní látka byla použita methylenová modř. Inkubace 5 minut, potom ozáření červenou LED (100 mW/cm2) (16)
* Současný výzkum se zaměřuje na identifikaci imunogenního proteinu prototékového původce a na vyvinutí imunoprofylaxe (17)
* Metodika a techniky izolace a identifikace prototéky by měly být zařazeny do rutinní praxe všech laboratoří, které se zabývají testací mastitidního mléka (17).
* Nutno eliminovat nadměrné empirické používání ATB při nespecifických mastitidách! Terapie by měla být vždy založena na laboratorní identifikaci patogenu a jeho citlivosti na léčiva! (17)

**Použitá literatura:**

1. Godkin, A. (2001) Prototheca – Unseen Danger. Dostupné z: <http://www.omafra.gov.on.ca/english/livestock/dairy/facts/danger.htm>
2. Kirk, J., Mellenberger, R. Mastitis Control Program for Prototheca Mastitis in Dairy Cows. Dostupné z: <http://milkquality.wisc.edu/wp-content/uploads/2011/09/mastitis-control-program_prototheca-mastitis.pdf>
3. Alves, A. C., Capra, E., Morandi, S.,Cremonesi, P., Pantoja, C. F., Langoni, H., de Vargas, A. P. C., da Costa, M. M., Jagielski, T., Bolaños, C. A. D., Guerra, S. T., Ribeiro, M. G., 2017. In vitro algicidal effect of guanidine on Prototheca zopfii genotype 2 strains isolated from clinical and subclinical bovine mastitis. LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY, Vol. 64, Iss. 6, Pg. 419-423
4. DiPersio, J. A Stubborn Finger Infection. Dostupné z: <http://hardydiagnostics.com/wp-content/uploads/2016/05/Case-History-No-7-DiPersio-Prototheca-Sept-2012.pdf>
5. Quinn, P. J., Markey, B. K., Leonard, F. C., FitzPatrick, E. S., Fanning S., Hartigan, P. J. 2011. Veterinary Microbiology and Microbial Disease, Second Edition. Blackwell Publishing, Ltd. Pg. 478-481.
6. Marques, S., Silva. E., Kraft, Ch., Carvalheira, J., Videira A., Huss, V. A. R., Thompson, G. 2008. Bovine Mastitis Associated with Prototheca blaschkeae▿ J Clin Microbiol. 2008 Jun; 46(6): 1941–1945.doi: 10.1128/JCM.00323-08
7. Marques, S., Silva, E., Carvalheira, J., Thompson, G. 2009. Phenotypic characterization of mastitic Prototheca spp. isolates. RESEARCH IN VETERINARY SCIENCE, Vol. 89, Iss. 1 Pg. 5-9.
8. Marques, S., Silva, E., Carvalheira, J., Thompson, G. 2010. In Vitro Susceptibility of Prototheca to pH and Salt Concentration. MYCOPATHOLOGIA, Vol. 169, Iss. 4, Pg. 297-302.
9. Marques, S., Silva, E., Carvalheira, J., Thompson, G. Short communication: temperature sensibility of Prototheca blaschkeae strains isolated from bovine mastitic milk. 2010. J. Dairy Sci. 93 :5110–5113.
10. Min, Z., Moser, S. A., Pappas, P. G. Prototheca wickerhamii algaemia presenting ascholestatic hepatitis in a patient with systemic lupus erythematosus: A case report and literature review. 2013. Medical Mycology Case Reports 2 (2013) 19–22.
11. Salerno, T., Ribeiro, M. G., Langoni, H., Siqueira, A. K., da Costa, E. O., Melville, P. A., Bueno, V. F. F., Yamamura, A. A. M., Roesler, U. da Silva, A. V. 2010. In vitro algaecide effect of sodium hypochlorite and iodine based antiseptics on Prototheca zopfii strains isolated from bovine milk. Research in Veterinary Science 88 (2010) 211–213.
12. Suvajdžić, B., Vasilev, D., Karabasil, N., Vučurović, I., Čobanović, N., Babić, M., Katić, V. 2017. Molecular identification of Prototheca zopfii genotype 2 mastitis isolates and their influence on the milk somatic cell count. VETERINARSKI ARHIV 87 (3), 249-258. doi: 10.24099/vet.arhiv.151219
13. Möller, A., Truyen, U., Roesler, U. 2007. Short communication: Prototheca zopfii genotype 2—The causative agent of bovine protothecal mastitis? Veterinary Microbiology 120 (2007) 370–374.
14. Prototheca Mastitis. Mastitis Patogen Factsheet #9. University of Minnesota College of Veterinary Medicine. Dostupné z: <https://www.vdl.umn.edu/sites/vdl.umn.edu/files/prototheca-mastitis.pdf>
15. Shahid, M., Wang, J., Gu, X., Chen, W., Ali, T., Gao, J., Han, D., Yang, R., Fanning, S., Han, B. 2017. Prototheca zopfii Induced Ultrastructural Features Associated with Apoptosis in Bovine Mammary Epithelial Cells. Front. Cell. Infect. Microbiol. 7:299. doi: 10.3389/fcimb.2017.00299.
16. Sellera, F. P., Sabino, C. P., Ribeirob, M. S., Gargano, R. G., Benites, N. R., Melville, P. A., Pogliani, F. C. 2016. In vitro photoinactivation of bovine mastitis related pathogens. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy 13 (2016) 276–281.
17. Milanov, D., Petrović, T., Polaček, V. Suvajdžić, L., Bojkovski, J. 2016. Mastitis associated with Prototheca zopfii - an emerging health and economic problem on dairy farms. J Vet Res 60, 373-378. DOI: 10.1515/jvetres-2016-0054.
18. Bozzo, G., Bonerba, E., Di Pinto, A., Bolzoni, G., Ceci, E., Mottola, A., Tantillo, G., Terio, V. 2014. Occurrence of Prototheca spp. in cow milk samples. New Microbiologica, 37, 459-464.
19. Ryšková, L., 2014. Fotodynamická antimikrobní terapie. Autoreferát disertační práce. Universita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové.
20. Gonçalves, J. L., Lee, S. H. I., de Paula Arruda, E., Galles, D. P., Caetano, V. C., de Oliveira, C. A. F., Fernandes, A. M., dos Santos, M. V. 2015. Biofilm-producing ability and efficiency of sanitizing agents against Prototheca zopfii isolates from bovine subclinical mastitis. J. Dairy Sci. 98:1–9. http://dx.doi.org/ 10.3168/jds.2014-9248.

Lassa, H., Jagielski, T., Malinowski. E. 2011. Effect of Different Heat Treatments and Disinfectants on the Survival of Prototheca zopfii. Mycopathologia (2011) 171:177–182. DOI 10.1007/s11046-010-9365-7.

**Zpracovala**: Ing. Eliška Nejedlá, Výzkumný ústav živočišné výroby, v. v. i., Praha – Uhříněves, nejedla.eliska@vuzv.cz