

## **Mastiidi diagnostika meetodid.**

Koostaja:

Toonika Rinke

TorroSen OÜ

Tartu, 2016



Euroopa Maaelu Arengu  
Põllumajandusfond:  
Euroopa investeeringud  
maapiirkondadesse

## Sisukord

Sissejuhatus.....	3
Mastiidi detekteerimise meetodid.....	5
1.    Somaatiliste rakkude arvu määramine spektrofotomeetriselt.....	5
2.    Somaatiliste rakkude arvu määramine viskosimeetriselt (CMT).....	6
3.    Laktaadi määramine.....	7
4.    Juhtivuse määramine.....	8
5.    Erinevate ionide suhtelise sisalduse määramine.....	9
6.    Amüloid A (MAA) määramine.....	10
7.    Haptoglobiini (Hp) määramine.....	11
8.    N-atsetüül- $\beta$ -D glükoosaminidaasi (NAGaasi) aktiivsuse määramine.....	12
9.    Laktaadi dehüdrogenaasi (LDH) aktiivsuse määramine.....	13
10.   Adenosiintrifosfaadi (ATP) määramine.....	14
11.   Mikrobioloogilised analüüsid.....	15
12.   Erinevate biomarkerite spektrofotomeetiline määramine.....	16
13.   Tsütomeetiline analüüs.....	17
14.   Kemoluminestsentsil põhinev analüüs.....	18
15.   PCR analüüsid.....	19
16.   ELISA analüüs.....	20
17.   Hübriidsatsioon fluorestsentsmärgistatud oliginukleotiididega.....	21
18.   Lahustunud hapniku mõõtmine piimas.....	22
Meetodeid iseloomustav kokkuvõtlik tabel.....	23
Kommertsiaalsed automaatsed mastiidi määramise lahendused:.....	24
Kokkuvõte.....	26
Lisad.....	27

## Sissejuhatus

Mastiiti ehk udarapõletikku põhjustavad peamiselt erinevad tõvestavad mikroorganismid ehk patogeenid, mis on tõsiseks ohuks nii inimeste kui loomade tervisele ning nende põhjustatud infektsioonide raviks kulub aastas miljardeid eurosid. Mastiit põhjustab jooksvalt 3-4% lehmade ravimise vajaduse ning seega olulise piimatoodangu kao loomade ravi ajal ja sellele järgneval keeluperioodil.

PRIA loomade registri andmetel oli piimalehmade arv Eestis 3. juuli 2016 seisuga 88 275 ning hinnanguliselt võiks kliinilisse mastiiti nakatunud loomi olla jooksvalt ligikaudu 3000. Eeldades, et mastiidi ravi kestab vähemalt 3 päeva, saame kliinilise mastiidi juhtumite arvuks aastas üle 150 000, mis ületab oluliselt lehmade arvu Eestis ja näitab, et paljud loomad põevad mastiiti mitu korda aastas. Veterinaar- ja toidulaboratooriumi andmetel olid 2010. aastal Eestis peamisteks mastiiditekitajateks *S. aureus* (19%), *S. uberis*(17%), *S. agalactiae* (9%) ja *E. coli* (9%); EMÜ 2013. a. avaldatud uuringute põhjal *S. uberis* (43%), *E. coli* (30%) ning *S. aureus* (22%),

USA-s tehtud uuringute alusel hinnatakse piimatoodagu vähenemise ja ravikulude maksumuseks prekliinilise mastiidi puhul ühe looma korral 240 € ning kliinilise mastiidi puhul 630 €. Mastiidi põhjustatud kogukuludest on prekliinilise mastiidi osa isegi kuni 80 %.

Kliinilise mastiidi avastamine toimub väliste tunnuste alusel ning üldjuhul määratakse haigestunud loomale ravi ilma haigustekitaja täpse identifitseerimiseta, sest mikrobioloogilised analüüsid võtavad aega 1 - 2 päeva (sõltuvalt haigustekitajast maksab analüüs 10-15 €); samas on ravi edukuse tagamiseks täpsuse kõrval oluline ka selle võimalikult operatiivne alustamine. Teaduslaborites ning ka Eesti Põllumajandusloomade Jõudluskontrolli (EPJ) keskuses on lisaks mikrobioloogilistele külvidele kasutusel ka patogeenide identifitseerimine geenianalüüsi alusel (PCR), kuid saadavate tulemuste interpreteerimine on keeruline ning analüüsi tegemiseks kulub vähemalt 6 tundi.

Patogeene, mis võivad olla potentsiaalselt ohtlikud inimese tervisele, sisaldab lisaks mastiitsete loomade piimale ka prekliinilise mastiidi all kannatavate loomade piim ning toorpiimale on sellepärast kehtestatud patogeenide sisalduse piinormid. Käesoleval ajal piimas leiduvate patogeenide kiireks identifitseerimiseks ning ka prekliinilise mastiidid detekteerimiseks farmides võimalused puuduvad.

Käesolevas aruandes on toodud teaduskirjanduse ja patendiandmebaaside põhjal koostatud ülevaade erinevatest võimalustest, mis on välja pakutud mastiidi detekteerimiseks. Ehkki erinevaid meetodeid on palju, on enamus neist rakendatavad vaid laboratoorses

tingimustes ning farmides on kasutusel süsteemid, mis põhinevad peamiselt piima jutivuse mõõtmisel ning spektomeetrilisel analüüsil. Kirjeldatud meetodite olulisemad parameetrid on toodud kokkuvõtlikult peatüki lõpus olevas tabelis. Eraldi peatükina on toodud välja kommertsiaalselt saadaolevad automaatsed seadmed mastiidi detekteerimiseks farmides.

Piimaklastri liikmetel on huvi korral võimalik täiendavat informatsiooni saada käesoleva kokkuvõtte Lisadest või kirjutades e-maili aadressil [toonikarinken@gmail.com](mailto:toonikarinken@gmail.com).

## Mastiidi detekteerimise meetodid.

1. Piimas leiduvate **somaatiliste rakkude arvu määramine spektrofotomeetrilisel** meetodil (patenditaotlus US2008000426; avaldamise number WO 2007146280 A2; Grabek et al., 2008, [https://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?CC=WO&NR=2007146280A2&KC=A2&FT=D&ND=3&date=20071221&DB=EPODOC&locale=en\\_EP](https://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?CC=WO&NR=2007146280A2&KC=A2&FT=D&ND=3&date=20071221&DB=EPODOC&locale=en_EP))

Piimas esinevad somaatilised rakud on valdavas enamuses vererakud – leukotsüüdid (valged verelibled), mis osalevad põletikutekitajate vastases immuunreaktsioonis. Kui loom haigestub, siis somaatiliste rakkude arv suureneb ja see aitab loomal terveneda. Lisaks on somaatiliste rakkude arv normaalsest suurem ka laktatsiooni alguses ja lõpus, eriti suur on see aga ternespiimas.

Eestis on toorpiima kvaliteediklasside nõuded kehtestatud põllumajandusministri määrusega nr. 79 (30.07.2008) (<https://www.riigiteataja.ee/akt/13010781>):

<b>Kvaliteediklass</b>	<b>Kirjeldus</b>	<b>Somaatiliste rakkude arv ml-s</b>
Eliit	Väga hea kvaliteet	$\leq 300\ 000$
Kõrgem	Hea kvaliteet	$\leq 400\ 000$
I	Rahuldav kvaliteet	$\leq 600\ 000$
II	Mitterahuldav kvaliteet	$> 600\ 000$

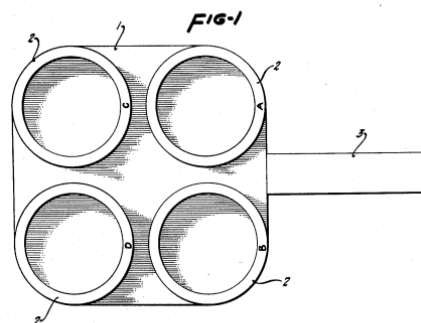
Patenditaotluses pakutud tehnoloogilise lahenduse puhul on mastiidi detekteerimise kriteeriumiks somaatiliste rakkude arv üle 200 000 rakku/ml, seega on selle meetodi rakendamine praktilisteks analüüsideks problemaatiline.

Patenditaotluse WO 2007146280 A2 täistekst on toodud Lisas 1.

2. Piimas leiduvate **rakkude arvu määramine viskosimeetriliselt**, kus piimale lisatakse anioonset pindaktiivset ainet, mis lõhustab rakkude kestad ning rakkude DNA moodustub testreagendiga geeli, mille viskoossus kalibreeritakse somaatiliste rakkude arvu alusel (patent US2935384; Schalm, O., Noorlander, D., 1960)

Antud meetod on lihtne ning seda on võimalik kasutada farmi tingimustes. Tuntakse ka California mastiiditesti (CMT) nime all. Meetod põhineb sellel, et piimale lisatakse anioonset pindaktiivset ainet, mille tulemusel piimas leiduvate (somaatiliste) rakkude membraanid lõhustatakse ning rakkudes olev DNA vabaneb ning moodustab geeli: mida viskoossem on segu, seda rohkem on piimaproovis rakke. Katse läbiviimiseks kasutatakse tavaliselt 4 süvendiga plastikalus, mille abil saab kontrollida erinevate udaraveerandike piima. Katse tegemiseks kulub ligikaudu 1 min.

Detergendina on võimalik kasutada ka laiatarbe detergente, näiteks väga hästi sobib Fairy nõudepesuvedelik.



CMT teste pakub käesoleval ajal müügiks DeLaval (<http://www.delaval-us.com/-/Product-Information1/Milking/Products/Milk-test--treatment/California-Mastitis-Test-CMT/California-Mastitis-Test-CMT/>)

Täpsem info testi kohta (läbiviimine, tundlikkus) on toodud Lisas 2.

**3. Laktaadi** määramine piimas (patent EP1192460, Agresearch, 2002) - bakterite toimel laktaadi kontsentratsioon udaras suureneb (anaeroobne keskkond)

Piimhape ja selle soolad, mida nimetatakse laktaadideks moodustuvad piimas piimasuhkrust ehk laktoosist mikroorganismide toimel.

L-laktaadi määramiseks kasutatakse mitmesuguseid laboratoorseid analüüsi meetodeid, nagu kõrgefektiivne vedelikkromatograafia (HPLC) ja spektrofotomeetiline meetod (UV test, ISO 139 084). Nende analüüsimeetodite kasutamise korral tuleb piimaproove rasva eraldamiseks eelnevalt töödelda. Töötlemata piimaproovide analüüsimiseks on välja pakutud ka biosensoritel põhinev meetod. Piima üldist happelisust on võimalik hinnata pH väärtuse alusel.

Väljapakutud meetodi puhul mõõdetakse piimas L - laktaadi sisaldust ning võrreldakse saadud tulemusi laktaadi sisaldusega tervete loomade piimas. On leitud, et L-laktaadi kontsentratsioon vahemikus 0,2 mM kuni 0,5 mM võiks olla indikaatoriks looma edasisele uurimisele võimaliku mastiidi suhtes; L-laktaadi kontsentratsioon üle 0,5 mM loetakse mastiidi olemasolu tunnuseks. L-laktaadi kontsentratsioon piimas omab tegelikult vaid indikatiivset väärtust, sest see sõltub mitmetest teguritest, nagu näiteks laktatsiooni perioodist ning looma vanusest.

Patendi EP1192460 nõudluspunktid on toodud Lisas 3.

4. Piima juhtivuse määramine (*conductivity*). See meetod on suhteliselt mittespetsiifiline, sest juhtivust mõjutavad bakteriaalse infektsiooni kõrval ka teised tegurid

Elektrilise juhtivuse (EC) muutus piimas mastiidi tekkimisel põhineb  $K^+$  ja  $Na^+$  ionide kontsentratsioonide suurenemisel ning pH ja rasvasisalduse muutumisel (*Kitchen B., Review of the progress of dairy science: Bovine mastitis: Milk compositional changes and related diagnostic tests, J. Dairy Res. 48 (1981) 167–188*). Lisaks sõltub juhtivus laktatsiooni pikkusest ning looma vanusest

Selle meetodi kõige olulisemaks puuduseks on asjaolu, et mastiit ei ole ainuke faktor, mis mõjutab piima juhtivust. Elektriline juhtivus korreleerub somaatiliste rakkude arvuga: samas on erinevate uuringute põhjal selle korrelatsiooni koefitsient ainult 0,51 - 0,75 (*Jensen N.E., Knudsen K., Inter-quarter comparison of markers of subclinical mastitis: somatic cell count, electrical conductivity, N-acetyl--D-glucosaminidase and antitrypsin, J. Dairy Res. 58 (1991) 389–399*). On leitud, et kontaktset mastiiti põhjustavad patogeenid *S. aureus* ja *S. agalactiae* põhjustavad väiksemat piima juhtivuse kasvu kui keskkonna kaudu levivad streptokokid (*Mansfeld R., Mansfeld S., Santl B., Hoedemaker M., New aspects regarding the use of the milk electrical conductivity as a parameter for routine diagnostics in dairy production medicine programs, in: 2nd Int. Symposium on Bovine Mastitis and Milk Quality, Vancouver, Canada, 2001, pp. 488–489*).

Rahvusvahelise Piimaföderatsiooni (IDF) eksperthinnangus leiti, et EC alusel ei saa määrata ei prekliinilist ega kliinilist mastiiti. Kaasaskantavate seadmete hindamisel oli positiivsetest proovidest 71% bakterioloogilise leiuta (valepositiivsed) ning negatiivsetest proovidest 11 % positiivse leiuga (valenegatiivsed) (*Hamann J., Zecconi A., Evaluation of the electrical conductivity of milk as a mastitis indicator, in: IDF bulletin 334, International Dairy Federation, Brussels, Belgium, 1998, vt ka Lisa 4*). Samas on viimasel ajal EC väärtust kombineeritud lüpstava piima kogusega (ja temperatuuriga) ning saadud paremaid tulemusi, ehkki mõõtealgoritmide salastatuse tõttu on saadavate tulemuste usaldusväärsust raske hinnata.

Tehniliselt on piima elektrilist juhtivust kerge mõõta ning see meetod on rakendatav piima automaatseks on-line analüüsiks (vt. kommertsiaalsed süsteemid - Afimilk'i süsteem).

Juhtivust on kasutatud firma Mueller-Meko piimatankides pesuainete sisalduse hindamiseks piimas (pesuainete jäägid piimas suurendavad juhtivust).



**5. Erinevate ionide suhtelise sisalduse määramine piimas.** Mastiidi puhul naatrium- ja kaaliumioonide omavaheline suhe piimas suureneb (rahvusvaheline patenditaotlus WO2006127921, Westfall, G., 2005)

Mastiitse põletiku arenemisel suurenevad piimas  $\text{Na}^+$  ja  $\text{Cl}^-$  ionide kontsentratsioonid ning vähenevad  $\text{Ca}^{2+}$  ja  $\text{K}^+$  ionide kontsentratsioonid. Seega mastiidi täpsemaks detekteerimiseks on võimalik määrata eraldi kõikide eelpoolnimetatud ionide kontsentratsioonid, sest mitme mõõtmise tulemuste kombineerimisel saadakse alati täpsem tulemus kui ühe mõõtmise tulemuste põhjal, ja arvutada kahe erineva iooni sisalduste suhted. Mastiidi iseloomustamiseks võib kasutada kas üksikult või kombineeritult järgmisi suhteid  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (kvaliteedi hindamiseks võib kasutada kriteeriumina väärtusi <30, <20, <15, <10),  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (<30, <20),  $\text{Cl}^-/\text{K}^+$  (<80, <50),  $\text{Cl}^-/\text{Ca}^{2+}$  (<80, <50). Arvutatud suhete alusel mastiidi olemasolu hindamiseks on vajalik võrrelda saadud suhteid erinevates piimaproovides, sest erinevatel lehmadel on nende ionide "normaalsed" sisaldused piimas väga erinevad.

Ehkki nimetatud meetodile esitati patenditaotlus (Lisa 5) 2005. aastal, ei ole selle tehnoloogia kaitseks käesoleva ajani patenti välja antud.

- 6. Piimas leiduva valgu amüloid A (milk amyloid A, MAA) määramine.** Vastuseks infektsioonile toodab imetajate organism akuutse faasi valke - lehma udaras konkreetset valku *milk amyloid A* (MAA) <http://www.trideltald.com/Milk-Amyloid-A.html>

MAA, mida hakatakse tootma piimanäärme põletiku korral, on üks esimesi piimas leiduvaid markervalke. Mastiidi korral võib MAA kontsentratsioon piimas suurenedagi kuni 1000 korda, paranemisel aga väheneb kiiresti. MAA taseme alusel saab määrata nii prekliinilist kui kliinilist mastiiti.

MAA määramiseks piimas laboratoorse uurimistöö eesmärgil pakub firma Tridelta Development ELISA (Enzyme Linked Immuni Sorbent Assay) tehnoloogial põhinevaid kitte (Lisa 6). Kahjuks nõuab MAA määramine kõrgkvalifitseeritud tööjõu olemasolu ning on töömahukas ja ei võimalda teha lauda tingimustes on-line analüüse.

**7. Haptoglobiini (Hp) määramine** – MAA kõrval teine mastiidi akuutse faasi valk, mille sisaldus piimas mastiidi korral suureneb

Hp on piimas määratav laboratoorsel analüüsil, mis põhineb Hp võimel seonduda hemoglobiinile. Piimale tetrametüülbensidiini lisamisel moodustuv kompleks määratakse neeldumise alusel 450 nm juures (*Hyvönen, P. et al, 2006, Infect.Immun. 74, 6206-6212*).

On leitud, et haptoglobiini tase mastiiti haigestunud lehmade piimas sõltub tugevasti mastiititi tekitava patogeeni iseloomust ning on *E. coli* ja *Str. dysgalactiae* põhjustatud mastiidi korral oluliselt kõrgem kui teiste patogeenide korral (*P. Kalmus, PhD Thesis, 2013, [https://dspace.emu.ee/xmlui/bitstream/handle/10492/1409/Piret\\_Kalmus\\_DO2014.pdf?sequence=1](https://dspace.emu.ee/xmlui/bitstream/handle/10492/1409/Piret_Kalmus_DO2014.pdf?sequence=1)*). Grönlundi jt. poolt läbiviidud uuringus saadi *E. coli* poolt põhjustatud mastiidi korral Hp väärtuseks piimas <0,3 - 358 mg/L (*Grönlund, U., Hallen - Sandgren, C., Persson Waller, K. Haptoglobin and serum amyloid A in milk from dairy cows with chronic sub-clinical mastitis, Vet. Res. 36, 2005, 191-198*). Kuna saadud tulemuste varieeruvus on väga suur, siis tõenäoliselt on Hp kontsentratsiooni kasutamine mastiidi biomarkerina küsitav.

Ülalpool refereeritud artiklid on toodud Lisas 7.

**8. Ensüümi N-atsetüül-β-D glükoosaminidaasi (NAGaasi) aktiivsuse määramine**  
(Hovinen , M. et al, 2010, in: *Proceedings of the 8th European Colloquium on Acute Phase Proteins, Aug. 25-27; Helsinki, Finland*)

N-atsetüül-β-D glükoosaminidaas (NAGaas) on intratsellulaarne ensüüm, mis eraldub piima neutrofiilidest fagotsütoosi ja rakkude pooldumise ajal ja vähesel määral kahjustatud epiteelirakkudest ning mida samuti võiks kasutada mastiidi biomarkerina (Kitchen B., Kwee W.S., Middleton G., Andrews R.J., *Relationship between the level of N-acetyl--D-glucosaminidase (NAGase) in bovine milk and the presence of mastitis pathogens, J. Dairy Res. 51 (1984) 11–16*). Samas enamus ensüümist on siiski rakkude sees ning selle määramiseks proovid esmalt külmutatakse ja sulatatakse. Probleemiks NAGaasi kasutamisel mastiidi biomarkerina on ka see, et NAGaasi loomulik aktiivsus on laktatsiooni esimestel päevadel (kuni 5 päeva peale poegimist) väga kõrge ning see suureneb ka laktatsiooni lõpuperioodil (Pyörälä S., Kaartinen L., *Milk plasmin, antitrypsin, N-acetyl--D-glucosaminidase and bacterial growth in lactoserum during the early post partum period, Acta vet. Scand. 29 (1988) 145–150*).

NAGaasi on piimaproovides võimalik määrata laboratoorselt fluorimeetriliselt, kommertsiaalseid teste saadaval ei ole. NAGaasi aktiivsust on proovitud mõõta ka elektrokeemiliselt, mis võiks olla potentsiaalne meetod mastiidi automaatseks määramiseks kas NAGaasi kontsentratsiooni alusel või kombineerituna koos teiste biomarkerite detekteerimisega (Mottram T., Hart J., Pemberton R., *Biosensing techniques for detecting abnormal and contaminated milk, in: Symposium on Robotic Milking, Lelystad, The Netherlands, 17–19 August, 2000, pp. 108–113, Lisa 8*).

## 9. Ensüüm laktaadi dehüdrogenaasi (LDH) aktiivsuse määramine piimas

Lisaks NAGaasile on mastiidi biomarkerina kasutamiseks välja pakutud ka teine ensüüm - laktaadi dehüdrogenaas, mille kontsentratsioon põletikuliste protsesside korral tõuseb. Välja on pakutud ka mudel LDH tasemete leidmiseks piimas, mille korral võiks potentsiaalselt eeldada mastiidi olemasolu. Mudelis võetakse sarnaselt punktis 4 toodud juhtivuse mudelile lisaks LDH tasemele piimas arvesse ka lüpstava piima kogus ning läbiviidud katsed kinnitavad võimalust pakutud meetodi potentsiaalseks kasutamiseks ([http://books.google.ee/books?id=9hOA\\_wWF9iEC&pg=PA617&lpg=PA617&dq=lactate+dehydrogenase+mastitis+milk&source=bl&ots=zEOsDH3bzZ&sig=Pt21XmtOCRoooyhsD18dzEefMnw&hl=en&sa=X&ei=fxowU8umK43H7AaWroFY&ved=0CDoQ6AEwAQ#v=onepage&q=lactate%20dehydrogenase%20mastitis%20%20milk&f=false](http://books.google.ee/books?id=9hOA_wWF9iEC&pg=PA617&lpg=PA617&dq=lactate+dehydrogenase+mastitis+milk&source=bl&ots=zEOsDH3bzZ&sig=Pt21XmtOCRoooyhsD18dzEefMnw&hl=en&sa=X&ei=fxowU8umK43H7AaWroFY&ved=0CDoQ6AEwAQ#v=onepage&q=lactate%20dehydrogenase%20mastitis%20%20milk&f=false), Lisa 9).

Klassikaliselt määratakse LDH kontsentratsiooni laboratooriumites spektrofotomeetriliselt, kuid see meetod nõuab piimaproovide tömahukat eeltötlust, sest piim on kolloidlahus, milles olevad erineva suurusega mitsellid hajutavad valgust. LDH täpseks määramiseks on välja pakutud ka kineetilistel mõõtmistel põhinev fluorimeetriline meetod, mis proovide eeltötlust ei nõua, kuid on läbiviidav vaid laboris (*Larsen, T. Determination of lactate dehydrogenase (LDH) activity in milk by a fluorometric assay, Journal of Dairy Research (72), 2005, 209-216*, Lisa 9a).

Kommertsiaalselt on saadaval erinevate tootjate LDH aktiivsuse määramiseks toiduainetes kasutatavad spektrofotomeetrilistel mõõtmistel põhinevad kitid (Sigma-Aldrich <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/mak066?lang=en&region=EE>, Abcam <http://www.abcam.com/lactate-dehydrogenase-ldh-assay-kit-colorimetric-ab102526.html>), kuid need ei ole eelpooltoodud põhjustel ette nähtud kasutamiseks piimatoodetes.

Shared Health Supplies pakub LDH määramiseks piimas testribasid (määramise aeg 1 min., 10 tk hind 20,93£), kuid mõõtmismeetodi kirjelduse puudumisel ei ole pakutav usaldusväärne ([http://www.sharedhealthsupplies.co.uk/veterinary/healthmate-ldh-lactate-dehydrogenase-milk-test-strips.html#.WBHh\\_196Uk](http://www.sharedhealthsupplies.co.uk/veterinary/healthmate-ldh-lactate-dehydrogenase-milk-test-strips.html#.WBHh_196Uk)).



LDH määramine on üks osa DeLivali Herd Navigatori mastiidi detekteerimise süsteemist.

## 10. Adenosiintrifosfaadi (ATP) määramine

Adenosiintrifosfaat (ATP) on universaalne energia talletaja ja ülekandja, mis on osaleb kõikide rakkude metabolismis ning on olemas kõikides elusates rakkudes, sh piimas leiduvates somaatiliste rakkudes.

ATP kontsentratsiooni on võimalik määrata bioluminestsentsi abil. Seda meetodikat kasutades on leitud tugev positiivne korrelatsioon ATP kontsentratsiooni ja somaatiliste rakkude arvu vahel ning selle alusel on pakutud välja ARP kasutamine mastiidi detekteerimiseks (*Emanuelson U., Olsson T., Mattila T., Åström G., Holmberg O., Effects of parity and stage of lactation on adenosine triphosphate, somatic cell count and antitrypsin content in cow's milk, J. Dairy Res. 55 (1988), 49–55, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3385067?dopt=Abstract>*). Käesoleval ajal kasutatakse bioluminestsentsil põhinevat ATP määramist peamiselt toiduainetetööstuses tootmisprotsessis bakteriaalse reostuse hindamiseks.

## 11. Mastiiditekitajate määramine **mikrobioloogiliste analüüside** abil

Mikrobioloogiline analüüs on käesoleval ajal kõige enamlevinud ja kindlam meetod mastiiditekitajate identifitseerimiseks. Meetod annab väga usaldusväärseid tulemusi, kuid väga oluline on proovide võtmise puhtus, et kogutavad proovid ei saastuks (Lisa 11). Kogutavad proovid viiakse laborisse, kus tehakse bakterioloogilised külvid, millest mastiiditekitaja isoleerimine võib võtta kuni 4 ööpäeva. Kahjuks on see liiga pikk aeg haigestunud loomade efektiivse ravi alustamiseks. Bakterioloogilisi uuringuid teostatakse Eestis järgmiste laboratooriumites:

- Veterinaar- ja Toidulaboratoorium (Tartu) bakterioloogia-patoloogia osakonnas
- Veterinaar- ja Toidulaboratoorium (Saaremaa) mikrobioloogia talituses
- Eesti Maaülikooli mikrobioloogia laboris
- Icosagen AS-s
- Terviseameti Kesklaboris

Veterinaar- ja toidulabori hinnakiri patogeenide määramiseks on toodud Lisas 11a.

Teaduskirjanduse on välja pakutud ka kiiremaid teste, nt. RAPIDEC Staph testid *S.aureus* mikroobide määramiseks (ajakulu 24 h), (Boerlin, P. et al., *J Clin Microbiol.*, 2003, 41(2): 767–771, Lisa 11b).

**12. Spektrofotomeetriselised** keemiliste reagentide kasutamisel põhinevad meetodid (patendid CN100460866, Ox. Biolog. Tech. Co Ltd, 2009 ja US6979550 Rivas et al., 2005), mille puhul lisatav reagent tekitab määratava ühendiga värvilise produkti

Meetod põhineb mitme erinevate biomarkerite määramisel ning saadud tulemuste alusel mastiidi diagnoosimisel. Piimas määratakse eraldi leukotsüütide, makrofaagide ja polümorfsete rakkude arv ja leitakse nende vahelised suhted; samuti "antigeenide tiheduse indeks", mis iseloomustab sidumiskohtade arvu leukotsüütide membraanil ja detekteeritud leukotsüütide hulka, ning rakkude alampopulatsioonide fagotsüütiline võimekus. Lisaks mastiidi identifitseerimisele pakutakse välja ka võimalus mastiidi arenemisetapi määramiseks (*US6979550 Rivas et al., 2005*, Lisa 12).

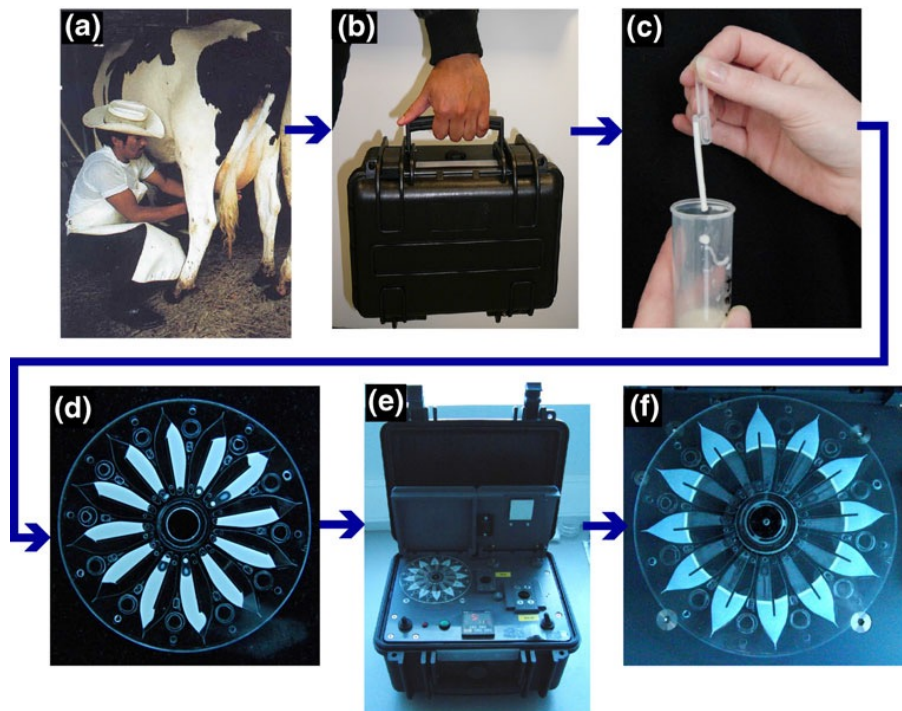
Ehkki meetod võib anda usaldusväärseid ja täpseid tulemusi, on selle läbiviimine ülimalt keerukas ja aeganõudev ning see ei ole teostatav farmi tingimustes.



### 13. Tsütomeetriline analüüs

Selle meetodi korral tsentrifugeeritakse värskelt lüpsitud piima spetsiaalsel kettal 15 minutit ning seejärel määratakse piimas olevad patogeenid sademe erinevates kihtides olevate rakkude arvu põhjal. Seade on kasutatav farmides.

Tsütomeetri kasutamine on kirjeldatud järgmisel joonisel. (a) lehma lüpsakse; (b) kaasaskantav seade; (c) pipetti võetakse 150 µl piima; (d) korraga saab analüüsida kuni 12 piimaproovi; (e) plaadi lugemiseks kasutatav seade; (f) 15 minutilise tsentrifugeerimise järel analüüsitakse rakkude arvu ning rasvafraktsiooni paksust (*Garcia-Gordero, J.L. et al, Biomed. Microdevices, 2010, (12), 1051-1059; Lisa 13*)



Laboratooriumis on tsütomeetrilisel analüüsil määratud piimas *S. aureus*'e patogeene 1 tunniga ning *S. aureus*e korral oli määramispiir  $10^4$  CFU/ml (*T. S. Gunasekera, P. V. Attfield and D. A. Veal, Appl. Environ. Microbiol., 2000, 66, 1228–1232*).

#### **14. Kemoluminestsentsil põhinev analüüs**

Kemoluminestsentsil põhineva analüüsi aluseks on fagotsüütide poolt bakterite neutraliseerimisel tekitatav valgussignaali (Takahashi, H.: *Cytokine Therapy for Staphylococcus Mastitis in Dairy Cows. Science & Technonews Tsukuba, 1999, 50: 55-56*).

Kahjuks ei ole täpsem info meetodi sobivusest kohapealseks rakendamiseks farmides ning meetodi tundlikkuse kohta kättesaadav.

## 15. PCR analüüsid patogeenide identifitseerimiseks

Polümeraasi ahelreaktsioon ehk PCR (lühend ingliskeelsest vastest *polymerase chain reaction*) on meetod DNA või RNA järjestuse kordistamiseks. Selleks, et amplifitseerida kindlat DNA järjestust, peab vähemalt osaliselt teadma uuritava DNA nukleotiidsed järjestust.

PCR-meetodi eeliseks on võrreldes mikrobioloogilise analüüsiga selle suhteline kiirus. Ühe fragmendi piisavas koguses amplifitseerimiseks kulub 2–3 tundi ning kogu määramiseks kuluv aeg on 4-6 tundi. Analüüsi suhtelise lihtsuse tagab protseduuri automatiseeritus. PCR meetodi puuduseks on vajadus teada proovis esinevate määratavate mikroobide DNA täpseid järjestusi. Lisaks ei ole PCR meetodiga võimalik eristada elus ja surnud mikroobe ning täpselt määrata mikroobide arvukust, kuna analüüsi tulemused sõltuvad mikroobide kasvufaasist ning ka erinevate liikide eripäradest.

PCR meetodil mastiiditekitajate määramiseks pakub võimalust Eesti Põllumajandusloomade Jõudluskontroll (JKK). Võimalik on tellida kas 4 (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma bovis* ja *Streptococcus uberis*; teenus Mastiit 4) või 15 erineva mastiiditekitaja (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Serratia marcescens*, *Corynebacterium bovis*, *Arcanobacter pyogenes*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma spp.*, pärmseen, *Prototheca spp*; teenus Mastiit 16) analüüsi. Analüüsiks kasutatakse Soome firma Finnzymes Oy patenteeritud *Pathoproof* meetodikat.

PCR analüüse tehakse laboratooriumis, kusjuures analüüsimiseks saadetavad piimaproovide peavad olema kogutud vastavalt nõuetele (vt. JKK kodulehel <https://www.jkkeskus.ee/jkk/piimaveised/piimaveiste-j%C3%B5udluskontrolli-lisateenused/mastiit-12.html> ning Lisa 15).

Ühe proovi analüüsimine maksab JKK-s 25-32 €, üksikasjalikum hinnakiri on toodud Lisas 15a.

## 16. ELISA analüüs

Patogeenide identifitseerimiseks ja nende arvukuse määramiseks võib kasutada ka immuunoensüümmeetodit ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), mis põhineb patogeeni äratundva komponendi immobiliseerimises tahkele pinnale, sellele pinnale määratava antigeeni sidumises ning seondunud antigeeni visualiseerimises spetsiifilise märgistatud antikeha abil ehk nn "võileiva" tegemises. Analüüs viiakse tavaliselt läbi mikrotiiterplaatidel.



Piimas *S. aureuse* määramiseks on välja pakutud meetod, kus määratakse *S. aureuse* poolt eraldatud termostabiilset nukleaasi (TNaas), mis seotakse magnetilistele nanoosakestele, millele on immobiliseeritud TNaasi vastased antikehad. Seondunud TNaasi määramiseks kasutatakse ensüümmärgistatud TNaasi vastaseid antikehasid. Ehkki selle meetodiga on võimalik määrata TNaasi kogust, mis on suurusjärgus 1 ng, vastab see *S. aureuse* kontsentratsioonile piimas  $10^5$  CFU/ml. Analüüsiks kulub keskmiselt 3 tundi, meetodit on põhimõtteliselt võimalik ka automatiseerida, (S. P. Yazdankhah, L. Sølverød, S. Simonsen and E. Olsen, *Vet. Microbiol.*, 1999, 67, 113–125, Lisa 16).

## 17. Patogeenide hübridisatsioon fluorestsentsmärgistatud oligonukleotiididega

Patogeenide määramine *in situ* fluorestsentsmärgistatud oligonukleotiidide abil pakuti välja 2013. aastal kui kiirem alternatiiv mikrobioloogilistele külvidele (Gey, A., Werckenthin, C., Poppert, S., Straubinger, R.K., *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2013, 25(3), 386-394, Lisa 17). Meetod on perspektiivne, kuid vajalik on mastiitsete piimaproovide eelnev töötlemine valkude ja rasvade eemaldamiseks. Proovide eeltötluseks kulub hinnanguliselt 1,5 tundi (proovi tsentrifuugitakse, töödeldakse valkude eraldamiseks savinaasiga, pestakse ning tsentrifuugitakse uuesti). Seejärel inkubeeritakse proove erinevate märgistatud oligonukleotiididega, mis seonduvad patogeenide DNA-ga. Kui otsitav patogeen on proovis olemas, siis märgisega nukleotiid seondub sellele selektiivselt ning seondunud märgisega oligonukleotiidide on võimalik pärast seondumata oligonukleotiidide mahapesemist mikroskoobi abil detekteerida.

Uuriti seitsme erineva patogeeni (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, and *Trueperella (Arcanobacterium) pyogenes*) määramise võimalusi. Bakterite detekteerimise alampiir oli  $10^6$  CFU/ml, mis arvatakse olevat ka ligikaudne alampiir kliinilise mastiidi tuvastamiseks, ehkki kliinilist mastiiti on diagnoositud ka lehmadel, kellel patogeenide kontsentratsioon piimas on madalam (Gey, A., Werckenthin, C., Poppert, S., Straubinger, R.K., *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2013, 25(3), 386-394, Lisa 17). Analüüsi aeg kokku on 3 - 3,5 tundi. Analüüs on poolkvantitatiivne ning tulemuste kinnitamiseks kasutatakse klassikalisi mikrobioloogilisi meetodeid.

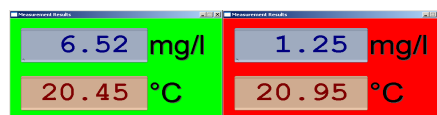
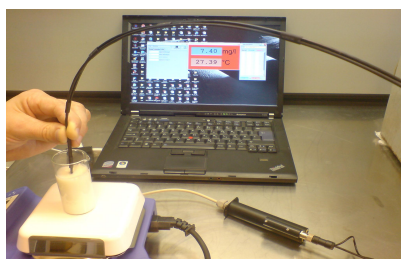
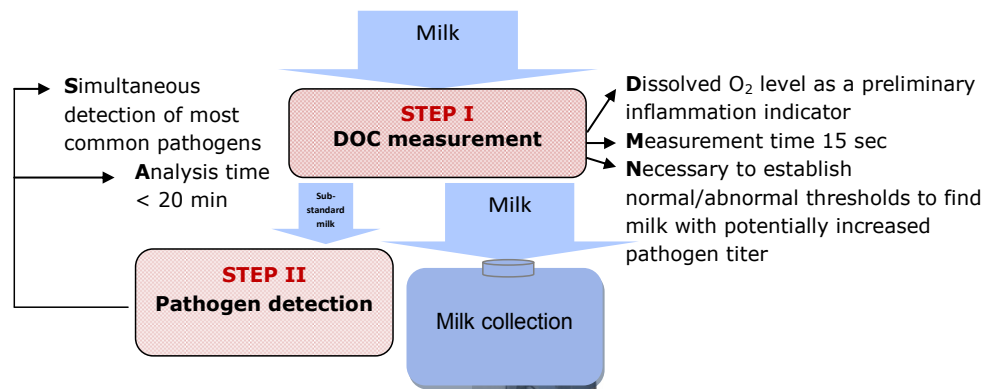
## 18. Piimas lahustunud hapniku mõõtmisel põhinev mastiidisensor

Leiutis käsitleb mastiidisensorit ning meetodit mastiidi tuvastamiseks ja piima kvaliteedi määramiseks reaalajas (*on-line*). Leiutis seisneb väljalüpsstavas piimas lahustunud molekulaarse hapniku kontsentratsiooni kiirel mitteinvasiivses mõõtmises. Mastiidisensor sisaldab fiiberoptilist, amperomeetrilist või potentsiomeetrilist hapniku kontsentratsiooni mõõtmise seadet, mõõtmisinfo kogumise ja töötlemise seadet, mastiidi indikaatorit ning vahendit väljundsignaali genereerimiseks, et õigeaegselt eraldada haigestunud looma mittekvaliteetne piim ja vältida suuremate piimakoguste saastumist.

Mastiidisensorit saab kasutada udarapõletiku kiireks tuvastamiseks reaalajas, sest ühe mõõtmise aeg alla 15 sekundi ning roostevaba ümbrisega sensorit saab paigutada piimatorustikku.

Mastiidisensori ja selle mõõtmismetoodika kaitseks on 2012.a. välja antud Eesti patent (EE 05552 B1, Lisa 18), mis on praguseks aegunud. Mastiidisensorit on võimalik kasutada esmase detektorina ning kombineerida seda arendatava patogeeni identifitseerimise biosensoriga.

Kiire kombineeritud piimaanalüüsi skeem on toodud järgmisel joonisel:



Ülalkirjeldatud meetodite olulisemad parameetrid on kokkuvõtlikult toodud allpoololevas tabelis:

### Meetodeid iseloomustav kokkuvõtlik tabel

	Meetod	Analüüsi läbiviimiseks vajalik aeg (hinnang)	Tundlikkus mastiidi suhtes	Kas saab identifitseerida haigustekitajat
1.	<b>Somaatiliste rakkude arvu määramine spektrofotomeetriliselt</b>	< 1 min	Haiguse kriteerium ebaselge	-
2.	<b>Somaatiliste rakkude arvu määramine viskosimeetriliselt (CMT)</b>	~1 min	Visuaalne hinnang	-
3.	<b>Laktaadi määramine</b>	HPLC - 6 tundi Sensorid ~10 min	Laktaadi tase > 0,5 mM	-
4.	<b>Juhtivus</b>	< 1 min	Ebaselge	-
5.	<b>Erinevate ionide suhteline sisaldus</b>	~15 min	Ebaselge	-
6.	<b>Amüloid A (MAA) määramine</b>	Min 4 tundi	Mastiidi korral MAA tase piimas tavapärasest oluliselt kõrgem	-
7.	<b>Haptoglobiini (Hp) määramine</b>	1-2 tundi	Hp tase piimas varieerub suures ulatuses	-
8.	<b>N-atsetüül-β-D glükoosaminidaasi (NAGaasi) aktiivsuse määramine</b>	~3 tundi	NAGaasi tase varieerub laktatsiooni jooksul tugevalt	-
9.	<b>Laktaadi dehüdrogenaasi (LDH) aktiivsuse määramine</b>	2-3 tundi	Täpsemate tulemuste saamiseks peaks kombineerima lüpstava piima kogusega	-
10.	<b>ATP määramine</b>	< 1 tund	Ebaselge	-
11.	<b>Mikrobioloogilised külvid</b>	Keskmiselt 2 ööpäeva	Väga hea	+
12.	<b>Erinevate biomarkerite spektrofotomeetriline määramine</b>	4-6 tundi	Ebaselge	-
13.	<b>Tsütomeetriline analüüs</b>	15-60 min	<i>S. aureuse</i> korral määramispiir 10 <sup>4</sup> CFU/ml	-
14.	<b>Kemoluminestsentsanalüüs</b>	1-2 ööpäeva	Ebaselge	-
15.	<b>PCR analüüs</b>	4-6 tundi	Hea	+
16.	<b>ELISA</b>	3-4 tundi	Hea	+
17.	<b>Hübridisatsioon fluorestsentsmärgistatud oliginukleotiididega</b>	~3-3,5 tundi, lisaks proovide eeltöötlus ~1,5 tundi	Patogeenide määramispiir 10 <sup>6</sup> CFU/ml	+
18.	<b>Lahustunud hapniku mõõtmine</b>	15 sek	Vaja määrata kriteeriumid	-

## Kommertsiaalsed automaatsed mastiidi määramise lahendused:

Käesolevas osas on toodud võrdlustabel erinevate firmade poolt pakutavate mastiidi detekteerimise süsteemide jaoks. Kasutatava meetodika lahtris on viide ka meetodika täpsemale kirjeldusele eelmises peatükis. Ülevaate Lisades 19 - 21 on toodud ka tootjapoolne informatsioon. Ühegi saadaoleva süsteemiga ei ole võimalik mastiiti tekitavaid patogeene identifitseerida.

	Tootja	Metoodika	Kommentaariid	Allikas
1.	<b>Afimilk</b>	Väljalüpstavas piimas mõõdetakse juhtivust, mis sisuliselt tähendab piima võimet voolu juhtida ehk siis laetud osakeste (ioonide) arvu piimas. Laetud osakesed on näiteks Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> jt ioonid (vt. meetod 4) Afimilk süsteemis määratakse lemapõhiselt piima tavapärane juhtivus, ja kui väljalüpstavas piimas tekib erinevus sellest tavapärasest tasemest, siis antakse teade mastiidi kahtluse kohta. "Vahele jäänud" lehmad suunatakse edasi täiendavasse veterinaarsesse kontrolli.	Juhtivuse alusel haigustekitajat ja vajalikku ravi määrata ei saa. Hinnanguliselt meetodi tundlikkus 70-80%, selektiivsus 0 (st. ei saa määrata haigustekitajat) ( <a href="http://www.nmconline.org/articles/cowside.pdf">http://www.nmconline.org/articles/cowside.pdf</a> )? Mõõtealgoritmi peaks kombineerima piima temperatuuriga ja kogusega.	<a href="http://www.afimilk.com/knowledge-center/articles/early-detection-clinical-and-sub-clinical-mastitis">http://www.afimilk.com/knowledge-center/articles/early-detection-clinical-and-sub-clinical-mastitis</a>  Tootjapoolne info Lisas 19.



2.	<b>Herd Navigator</b>	Samal ajal, kui lehmi lüpstakse, võetakse teatud lüpsikohtadest ka piimanäidiseid ja saadetakse neid ükshaaval analüüsimisele. Süsteem valib automaatselt intelligentse bioloogilise mudeli kaudu ise, milliseid lehmi testida, millise lüpsisessiooni ajal teatud lehmi jälgida ja milliseid parameetreid mõõta. Mõõdetakse laktaatdehüdrogenaasi (LDH) taset (vt. meetod 9)	Selle süsteemi abil ei saa patogeene identifitseerida. Analüüsi aega ei saa täpsemalt öelda, see sõltub kasutatavast LDH määramise meetodikast.	<a href="http://www.delaval.ee/-/Tooted-ja-lahendused/farmihaldus/lahendused/Herd-navigator/Kuidas-Herd-Navigator-tootab/">http://www.delaval.ee/-/Tooted-ja-lahendused/farmihaldus/lahendused/Herd-navigator/Kuidas-Herd-Navigator-tootab/</a>  Tootjapoolne info Lisades 20 (eesti keeles) ja 21 (inglise keeles).
3.	<b>Lely Astronaut lüpsirobot</b>	Automaatselt määratakse somaatiliste rakkude arv (vt. meetod 1)	Ei saa patogeene identifitseerida. Subkliinilise mastiidi kahtluse korral tuleb sobiva ravi määramiseks haiguskahtlusega loomade piimas identifitseerida mastiiditekitajad mikrobioloogiliselt	<a href="https://www.lely.com/farming-insights/mastitis-dairy-cows/">https://www.lely.com/farming-insights/mastitis-dairy-cows/</a>
	<b>Lely (varasem süsteem, tootmine lõpetatud?)</b>	Lely offers you the best and most reliable mastitis detection available on the market, with more than 99% correct analysis of	Ei saa patogeene identifitseerida. Mastiidi määramine 99%-lise tõenäosusega on	<a href="http://www.lely.com/uploads/original/documents/Variou PDF documents/interactive-mqc-">http://www.lely.com/uploads/original/documents/Variou PDF documents/interactive-mqc-</a>

		<p>milkings (exceeding ISO qualification requirements by far). Measurements per milking per quarter include the detection of conductivity, colour, milk yield as well as dead milking times. As a consequence you can detect mastitis as well as any abnormal milk at the earliest stage possible, allowing you to prevent cow illnesses and achieve guaranteed optimal milk quality</p>	väheusutav.	<a href="#">card-en.pdf</a>
--	--	--	-------------	-----------------------------

### **Kokkuvõte**

Mastiidi diagnoosimiseks piimas on välja pakutud väga erinevaid meetodeid. Enamik olemasolevatest meetoditest, mis põhinevad kaudsete mastiidi markerite määramisel on seetõttu suhteliselt madala usaldusväärsusega ning põhjustavad palju valepositiivseid ja valenegatiivseid tulemusi. Patogeenide identifitseerimist võimaldavate meetodite puuduseks on aga analüüsiks kuluv liiga pikk aeg või keerukus, mis ei võimalda piima analüüsida farmi tingimustes ning eeldab piimaproovide transporti analüüsi läbiviivasse laborisse.

Kiired meetodid patogeenide identifitseerimiseks ning kvantiseerimiseks lüpstavas piimas ja selle alusel ka prekliiniline mastiidi detekteerimiseks käesoleval ajal puuduvad.