

Kvantifikace obsahu mastitidních patogenů v mléce a mlezivu dojnic, ovcí a koz

Metodika z projektu MZe ČR č.QJ1210301 “Výzkum, nové produkty a služby pro vytvoření centra prevence, detekce a podpory léčby mastitid”

Autoři: Irena Vrtková (40%), Jakub Surýnek (60%)
Laboratoř agrogenomiky, Ústav morfologie, fyziologie a genetiky živočichů,
Mendelova univerzita v Brně

Dedikace metodiky:

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu MZe ČR QJ1210301 Výzkum, nové produkty a služby pro vytvoření centra prevence, detekce a podpory léčby mastitid.

Oponentské posudky zpracovali: Ing. Zdenka Majzlíková, ČPI Praha
prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc., JU České Budějovice

Smlouvy s uživateli:

LAMGen s.r.o., MSP s činností v inovacích a vývoji pro živočišné biotechnologie.
GENSERVICE s.r.o., zkušební laboratoř molekulární genetiky a cytogenetiky.

Obsah:

Cíl

Vlastní popis

Kvantifikace obsahu mastitidních patogenů v mléce a mlezivu

A) Odběry vzorků

B) Laboratorní protokoly

1. Izolace DNA

2. Určení množství (kvantifikace) mastitidních patogenů v mléce a mlezivu

2.1. qPCR duplex detekce *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus* spp

2.2. qPCR duplex detekce *Streptococcus dysgalactiae* a *Streptococcus uberis*

2.3. qPCR detekce *Streptococcus agalactiae*

2.4. qPCR detekce *Mycoplasma bovis*

Srovnání novosti postupů

Popis uplatnění

Ekonomické aspekty

Seznam použité související literatury

Seznam publikací, které předcházely metodice

Cíl

Cílem metodiky je:

1. Zavést v ČR rychlou kvantifikaci obsahu mastitidních patogenů v mléce a mlezivu.
2. Umožnit chovatelům využít tuto metodu k odhalení rozsahu subklinických mastitid a jejich původců ve stádě.
3. Dát chovatelům nástroj umožňující při skladování a uchování vzorků mleziva a vzorků z akutních a mastitid provést z těchto vzorků zpětnou analýzu a tím odhalovat a analyzovat příčiny mastitid.

Vlastní popis

Kvantifikace obsahu mastitidních patogenů v mléce a mlezivu

A) Odběry vzorků

Stanovení obsahu mastitidních patogenů lze provádět ve vzorcích z různých zdrojů a v různých typech vzorků. Lze využít bazénové vzorky, individuální vzorky, vzorky z jednotlivých čtvrtí i vzorky mleziva.

Lze použít vzorky mléka a mleziva čerstvého, mraženého nebo konzervovaného konzervačními činidly.

Logistiku a odběry individuálních a bazénových vzorků přesně popisuje metodika Vrtková 2014.

Vzorky pro zpětnou analýzu uchovávané mražením je dostatečně udržovat při teplotě -18 až -20 °C (běžně používané mrazicí boxy). Zpětnou analýzu lze provést i u vzorků mléka krav léčených a přeléčených antibiotiky, a u vzorků s inhibicí růstu mikroorganismů.

Zpětná analýza může být přínosná při změnách managementu stáda (změnách v technologii, krmení, podestýlce atd.). Především však při náhlém zvýšení počtu somatických buněk v BTM (což indikuje subklinické mastitidy), si chovatel může uchovávat individuální vzorky nebo vzorky malých, vybraných skupin (prvotelky, krávy na počátku laktace atd., které mohou výrazně ovlivnit SB v BTM) a zpětně si pak udělat analýzu určitého období.

B) Laboratorní protokoly

Identifikace a kvantifikace je založena na detekci bakteriálního genomu metodou qPCR (kvantitativní PCR).

1. Izolace DNA

Bakteriální DNA je izolována z čerstvého nebo konzervovaného mléka nebo mleziva komerčně dodávanými kity pro izolaci DNA. Postup izolace se řídí manuálem k příslušnému kitu.

V Laboratoři agrogenomiky Mendelovy univerzity v Brně byly validovány a zavedeny pro izolaci bakteriální DNA z mléka:

PowerFood Microbial DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories, Inc., USA)

PathoProof QIAGEN DNA extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, USA)

JetQuick blood and cell culture DNA spin Kit (GenomedSM, USA)

QIAamp DNA Extraction kit (QIAGEN, Germany)

2. Určení množství (kvantifikace) mastitidních patogenů v mléce a mlezivu

2.1. qPCR duplex detekce *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus* spp

Testované geny:

S. aureus – nuc

Staphylococcus spp. – tuf

Sekvence a označení primerů a sond:

Označení	Sekvence 5'→3'	Modifikace
Saunuc_F	GTTGCTTAGTGTTAACTTTAGTTGTA	
Saunuc_R	AATGTCGCAGGTTCTTTATGTAATT	
Saunuc_P	AAGTCTAAGTAGCTCAGCAAATGCA	HEX-BHQ1
Staphtuf_F	AAACAACGTGTTACTGGTGTAGAAATG	
Staphtuf_R	AGTACGGAAATAGAATTGTG	
Staphtuf_P	TCCGTAAATTATTAGACTACGCTGAAGC	Cy5-BHQ2

Zdroj primerů a sond: Kilic A. et al. 2010

Příprava amplifikační směsi:

Amplifikační směs připravujeme do stripů nebo plat určených pro qPCR. Celkový objem reakční směsi je 20 μ l.

Komponenta	Konc. zásobní (μ M)	Konc. v reakci (μ M)	Objem v reakci (μ l)
Voda pro PCR	-	-	318
Saunuc_F	100	9	18
Saunuc_R	100	9	18
Saunuc_P	100	25	5
Staphtuf_F	100	9	18
Staphtuf_R	100	9	18
Staphtuf_P	100	25	5
UCO assay mix*	-	-	2
UCO standard*	-	-	2
mastermix**	2x	1x	10
DNA	-	-	2

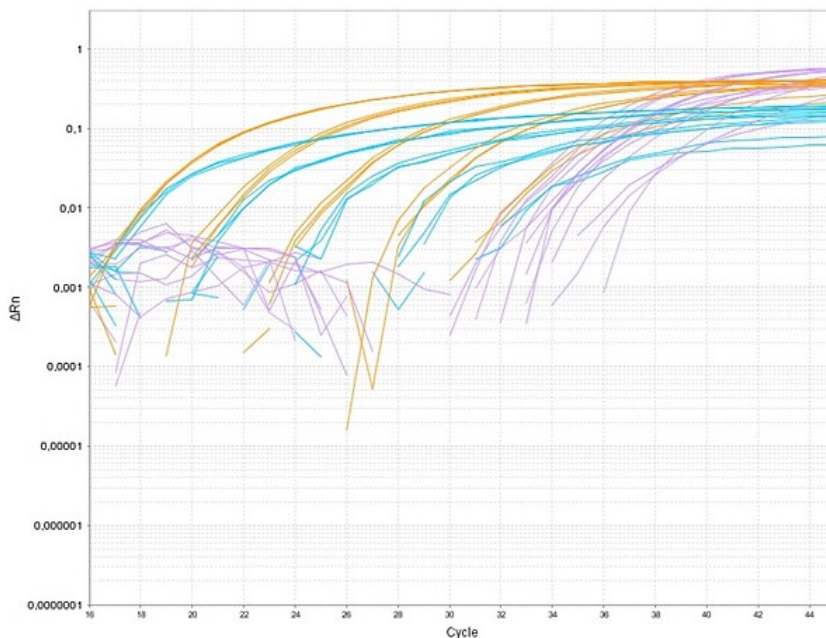
*Generi Biotech s.r.o., Hradec Králové

**q PCR mastermix určený výrobcem pro použití s fluorescenčními sondami a pro multiplexní aplikace

Program cyklování:

– řídí se doporučeními výrobce mastermixu a real-time PCR přístroje

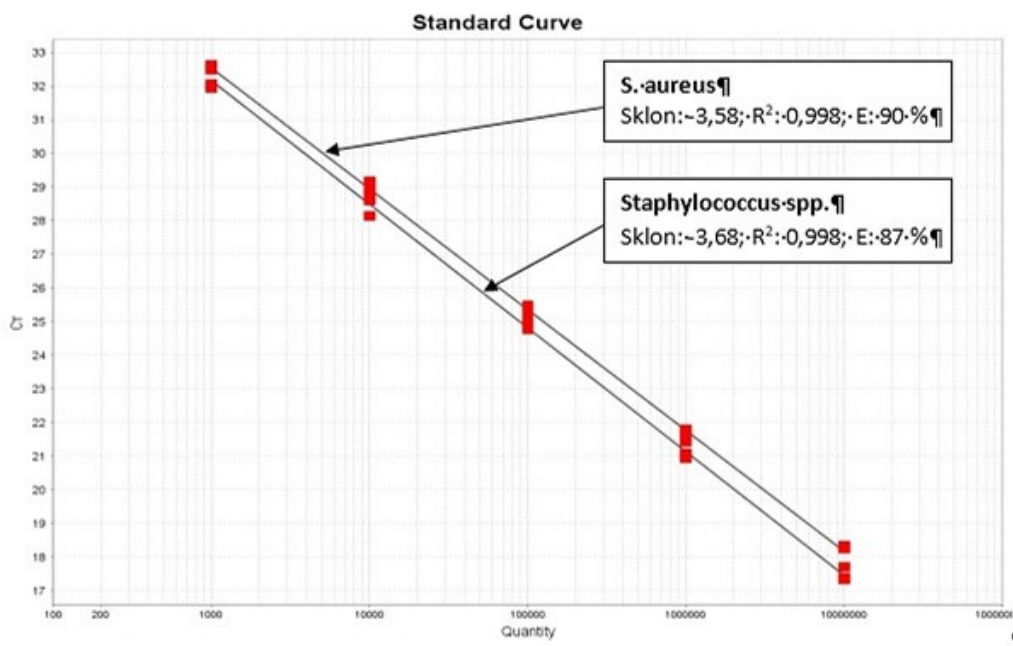
Krok	Teplota (°C)	Čas (min)
Úvodní denaturace	95	10
40 cyklů		
denaturace	95	15 s
annealing+elongace	60	1



Legenda: Amplifikační křivky duplex *S. aureus* (oranžová) a *Staphylococcus* spp. (modrá); standardy 10^7 až 10^3 kopií; fialová – vnitřní amplifikační kontrola.

Kvantifikace

V každém runu společně s neznámými vzorky amplifikujeme ředící řadu alespoň 5 standardů (10^7 – 10^3 kopií/ μ l) ve třech opakováních. Nejkoncentrovanější standard připravíme tak, že spektrofotometricky změříme obsah DNA v izolátu mikroorganismu v ng/ μ l a přepočteme jej na počet kopií pomocí velikosti genomu v bp a průměrné molární hmotnosti bázevého páru. Desítkovým ředěním nejkoncentrovanějšího standardu připravíme zbývající. Proložení průměrů naměřených C_t hodnot standardů přímkou dostaneme kalibrační přímkou. Z rovnice přímky $y = ax + b$ se vypočítá počet kopií/ μ l v neznámém vzorku. Výpočet většinou provádí program k qPCR přístroji.



2.2. qPCR duplex detekce *Streptococcus dysgalactiae* a *Streptococcus uberis*

Testované geny:

U obou bakterií gen *cpn60*, jehož produktem je protein Cpn60, fungující jako protein teplotního šoku u bakterií.

Sekvence a označení primerů a sond:

Označení	Sekvence 5' → 3'	Modifikace
Sdycpn60_F	GCGATTGCTCAGCCTGTTTCT	
Sdycpn60_R	GGCTTCTGAAATGTATTCTCCAA	
Sdycpn60_P	TTGCTGCTGTGTCATCTCGTTCTG	Cy5-BHQ2
Subcpn60_F	GAAGAATCACGTGGTATGGAAACAGAA	
Subcpn60_R	AGAAGGGGACGACTGGTTTTAAGC	
Subcpn60_P	TGAAGGGATGCAATTTGACCGCGGA	HEX-BHQ1

Zdroj primerů a sond: vlastní návrh Surýnek

Příprava amplifikační směsi:

Amplifikační směs připravujeme do stripů nebo plat určených pro qPCR. Celkový objem reakční směsi je 20 μ l.

Komponenta	Konc. zásobní (μ M)	Konc. v reakci (μ M)	Objem v reakci (μ l)
Voda pro PCR	-	-	315
Sdycpn60_F	100	9	18
Sdycpn60_R	100	9	18
Sdycpn60_P	100	25	5
Subcpn60_F	100	9	18
Subcpn60_R	100	9	18
Subcpn60_P	100	4	8
UCO assay mix*	-	-	2
UCO standard*	-	-	2
mastermix**	2x	1x	10
DNA	-	-	2

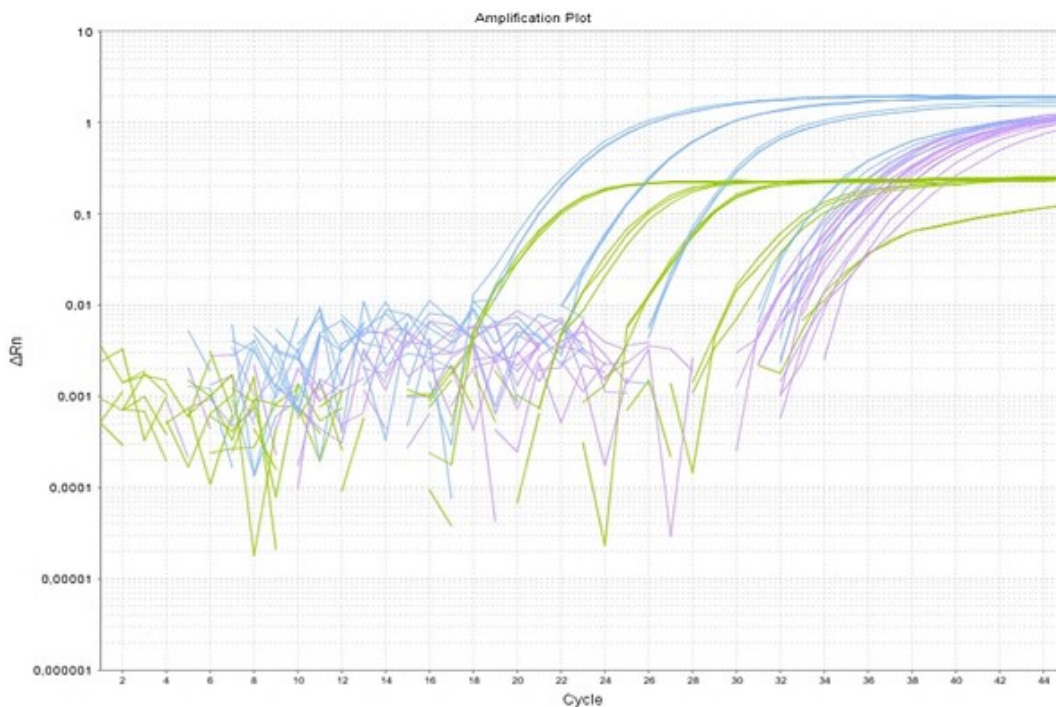
*Generi Biotech s.r.o., Hradec Králové

**qPCR mastermix určený výrobcem pro použití s fluorescenčními sondami a pro multiplexní aplikace

Program cyklování:

- řídí se doporučeními výrobce mastermixu a real-time PCR přístroje

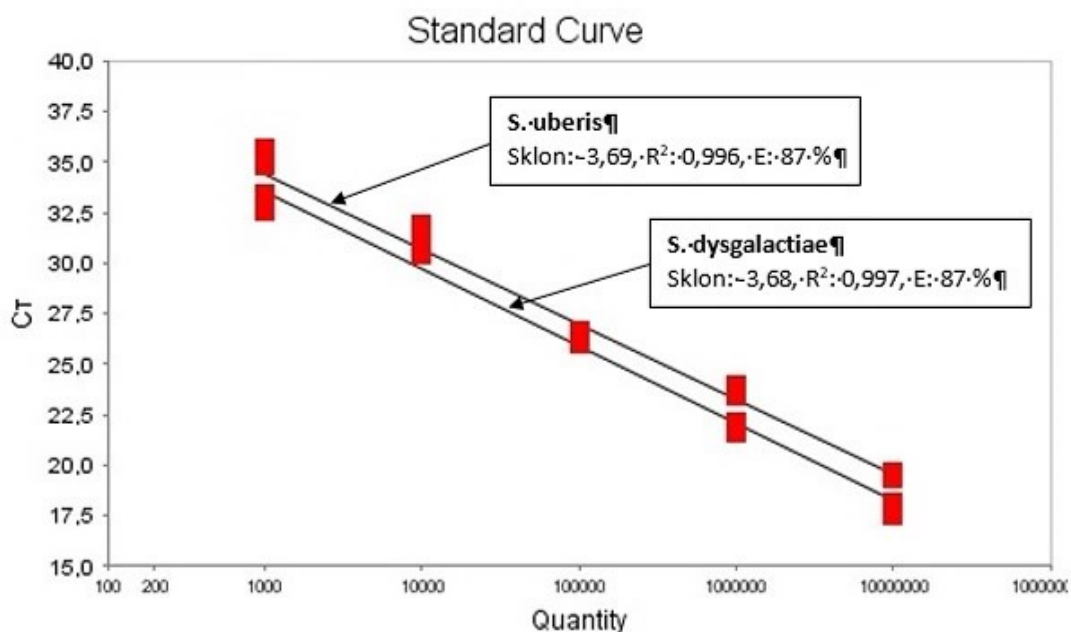
Krok	Teplota ($^{\circ}$ C)	Čas (min)
Úvodní denaturace	95	10
45 cyklů		
denaturace	95	15 s
annealing+elongace	60	1



Legenda: Amplifikační křivky duplex *S. dysgalactiae* (modrá) a *S. uberis* (zelená); standardy 10^7 až 10^3 kopií; fialová – vnitřní amplifikační kontrola (UCO).

Kvantifikace

V každém runu společně s neznámými vzorky amplifikujeme ředící řadu alespoň 5 standardů (10^7 – 10^3 kopií/ μ l) v triplikátu. Standardy připravíme desítkovým ředěním izolátu DNA mikroorganismu, který chceme kvantifikovat. Proložení naměřených C_t hodnot standardů přímkou dostaneme kalibrační přímkou. Z rovnice přímky $y = ax+b$ se vypočítá počet kopií/ μ l v neznámém vzorku. Výpočet většinou provádí program k qPCR přístroji.



2.3. qPCR detekce *Streptococcus agalactiae*

Testovaný gen: gen *cpn60*, jehož produktem je protein Cpn60, fungující jako protein teplotního šoku.

Sekvence a označení primerů a sond:

Označení	Sekvence 5' → 3'	Modifikace
Sagcpn60_F	TGCTCAAGTTGCAGCTGTGTCT	
Sagcpn60_R	TCAAGCTCTGTTTCCATACCTCGC	
Sagcpn60_P	TGGAGCGCGTGGGTAATGATGGTG	FAM-BHQ1

Zdroj primerů a sondy: vlastní návrh Surýnek

Příprava amplifikační směsi:

Amplifikační směs připravujeme do stripů nebo plat určených pro qPCR. Celkový objem reakční směsi je 20 μ l.

Komponenta	Konc. zásobní (μ M)	Konc. v reakci (μ M)	Objem v reakci (μ l)
Voda pro PCR	-	-	359
Sagcpn60_F	100	9	18
Sagcpn60_R	100	9	18
Sagcpn60_P	100	25	5
UCO assay mix*	-	-	2
UCO standard*	-	-	2
mastermix**	2x	1x	10
DNA	-	-	2

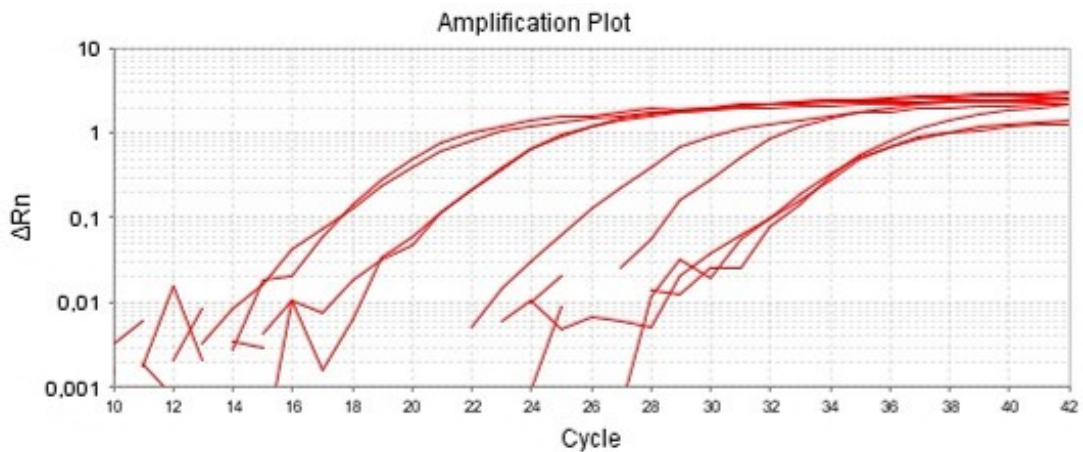
*Generi Biotech s.r.o., Hradec Králové

**qPCR mastermix určený výrobcem pro použití s fluorescenčními sondami a pro multiplexní aplikace

Program cyklování:

- řídí se doporučeními výrobce mastermixu a real-time PCR přístroje

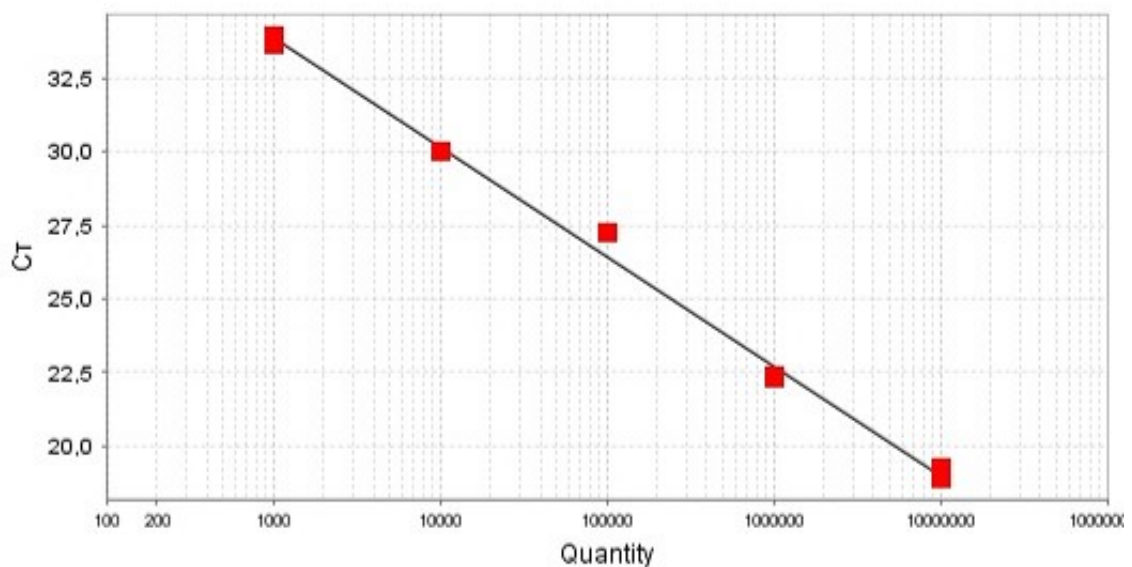
Krok	Teplota (°C)	Čas (min)
Úvodní denaturace	95	10
45 cyklů		
denaturace	95	15 s
annealing+elongace	60	1



Legenda: Amplifikační křivky *S. agalactiae*, řada 5 standardů $10^7 - 10^3$ kopií.

Kvantifikace

V každém runu společně s neznámými vzorky amplifikujeme řadu alespoň 5 standardů (10^7-10^3 kopií/ μ l) v triplicátu. Standardy připravíme ředěním izolátu DNA mikroorganismu, který chceme kvantifikovat. Proložení naměřených C_t hodnot standardů přímkou dostaneme kalibrační přímkou. Z rovnice přímky $y = ax+b$ se vypočítá počet kopií/ μ l v neznámém vzorku. Výpočet většinou provádí program k qPCR přístroji.



2.4. qPCR detekce *Mycoplasma bovis*

Testovaný gen: *oppD* – gen pro permeázu oligopeptidů

Sekvence a označení primerů a sond:

Označení	Sekvence 5'→3'	Modifikace
MbooppD_F	TCAAGGAACCCCACCAGAT	
MbooppD_R	AGGCAAAGTCATTTCTAGGTGCAA	
MbooppD_P	TGGCAAACCTACCTATCGGTGACCCT	FAM-BHQ1

Zdroj primerů a sondy: Sachse K. et al. 2010

Příprava amplifikační směsi:

Amplifikační směs připravujeme do stripů nebo plat určených pro qPCR. Celkový objem reakční směsi je 20 µl.

Komponenta	Konc. zásobní (µM)	Konc. v reakci (µM)	Objem v reakci (µl)
Voda pro PCR	-	-	2
MbooppD_F	10	4	8
MbooppD_R	10	4	8
MbooppD_P	10	2	4
UCO assay mix*	-	-	2
UCO standard*	-	-	2
mastermix**	2x	1x	10
DNA	-	-	2

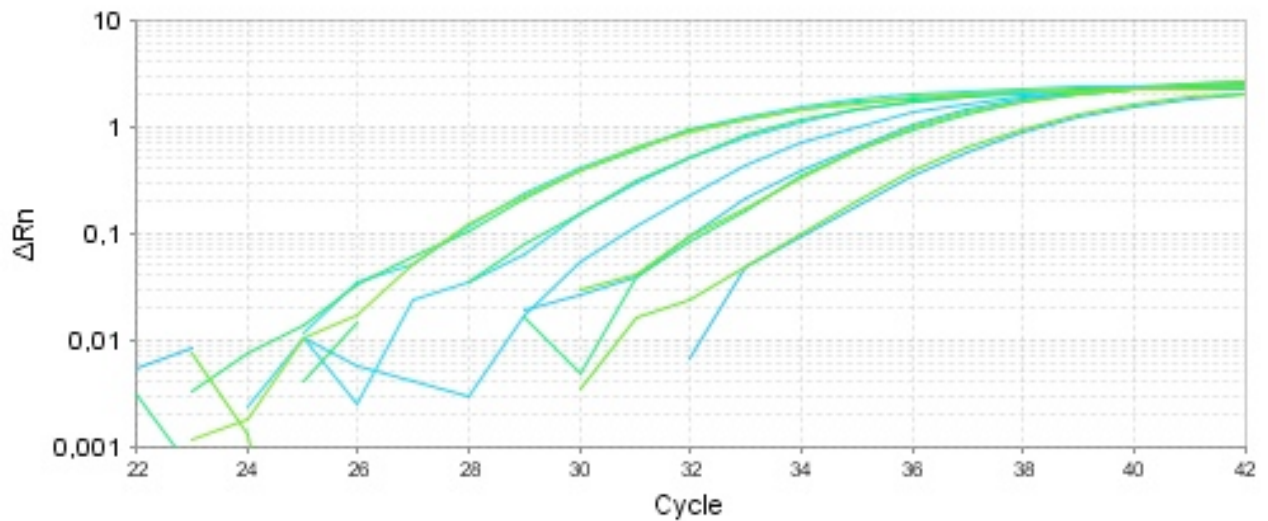
*Generi Biotech s.r.o., Hradec Králové

**qPCR mastermix určený výrobcem pro použití s fluorescenčními sondami a pro multiplexní aplikace

Program cyklování:

– řídí se doporučeními výrobce mastermixu a real-time PCR přístroje

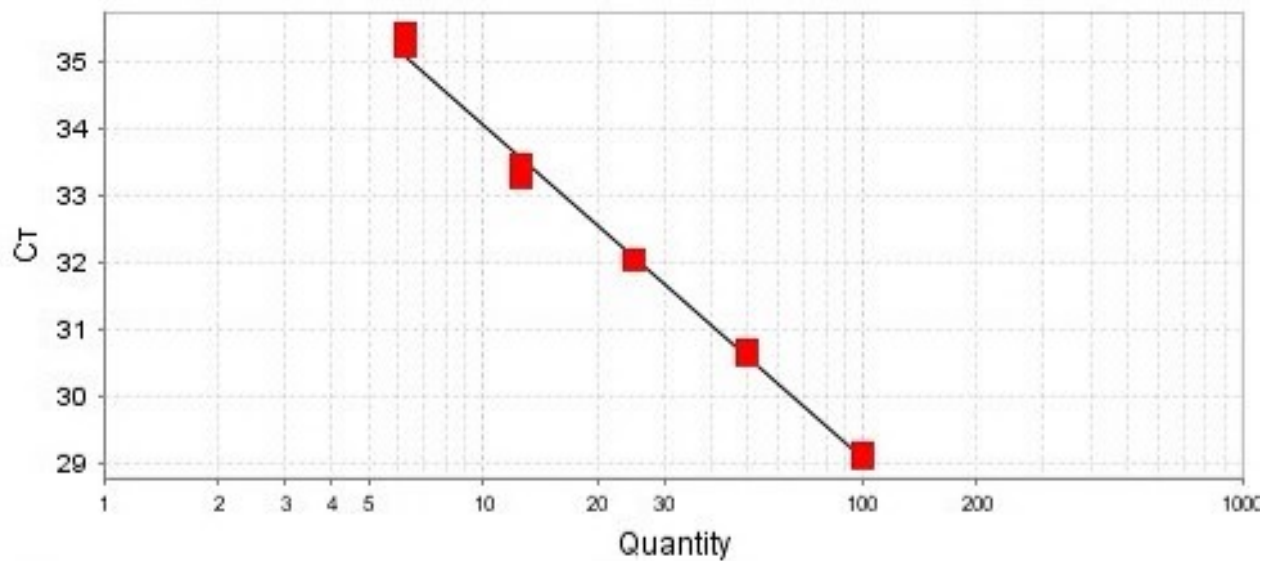
Krok	Teplota (°C)	Čas (min)
Úvodní denaturace	95	10
40 cyklů		
denaturace	95	15 s
annealing+elongace	60	1



Legenda: Amplifikační křivky *M. bovis*, řada 5 standardů ředěných v poměru 1:2.

Kvantifikace

V každém runu společně s neznámými vzorky amplifikujeme řadu alespoň 5 standardů (10^7 – 10^3 kopií/ μ l) v triplikátu. Standardy připravíme ředěním izolátu DNA mikroorganismu, který chceme kvantifikovat. Proložení naměřených C_t hodnot standardů přímkou dostaneme kalibrační přímku. Z rovnice přímky $y = ax+b$ se vypočítá počet kopií/ μ l v neznámém vzorku. Výpočet většinou provádí program k qPCR přístroji.



Srovnání novosti postupů

1.

Kvantifikace patogenů je ve vyspělých zemích pro chovatele prováděna. V ČR byla v rámci projektu QJ1210301 zahájena semikvantitativní detekce patogenů metodou 12-Complete PathoProof PCR Mastitis Assay (Vrtková, 2014).

Poprvé v ČR byl pro vývoj technologie kvantifikace obsahu patogenů v rámci ČR v projektu proveden screening 240 BTM (zahrnující cca 49000 dojených krav).

Na jeho základě byly do tvorby "národního panelu" vybrány následující mastitidní patogeny (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus* spp, *Streptococcus uberis* a dále *Mycoplasma bovis*).

Důvodem volby uvedených patogenů bylo:

A) infekčnost *Staphylococcus aureus* – prevalence 38%
Streptococcus agalactiae – prevalence 23%

B) prevalence nad 40%
Streptococcus dysgalactiae – 43%
Staphylococcus spp – 83%
Streptococcus uberis – 74%

C) obtížná detekce
Mycoplasma bovis.

Tento patogen se ve vzorcích zahrnutých do screeningu nevyskytoval, ale vzhledem k jeho obtížné bakteriální kultivaci a možnosti budoucího výskytu v mléce v ČR byla metoda navržena.

2.

Nově byly navrženy a konstruovány oligonukleotidové primery a sondy pro qPCR duplex detekce *Streptococcus dysgalactiae* a *Streptococcus uberis* a qPCR singleplex detekce *Streptococcus agalactiae* k zajištění robustnosti metody kvantifikace.

3.

Přínos naší metodiky je v podstatně přesnějším stanovení množství patogenu ve vzorku. V ČR bylo doposud možno ke kvantifikaci obsahu patogenů využít pouze semikvantitativní PathoProof PCR Assay. Kvantifikace byla definována pouze třemi kritérii (+++ vysoký obsah bakteriální DNA, ++ střední obsah bakteriální DNA, + nízký obsah bakteriální DNA).

4.

Z úhlu pohledu chovatele lze za novost pokládat i ekonomický benefit testování obsahu patogenů v mléce, vycházející z nově navržených a konstruovaných primerů a sond. (Pathoproof Mastitis PCR assay zahrnující 12 mikroorganismů – cena reagensií 390,- Kč na vzorek, PathoProof Mastitis PCR assay zahrnující detekci 3 mikroorganismů – cena reagensií 340,- Kč na vzorek, cena reagensií pro detekci 6 mikroorganismů vycházející z této metodiky je 163,- Kč).

5.

Další novostí pro chovatele je námět na možnost zpětných analýz vývoje stáda a eventuálního odhalení některých z příčin výskytu mastitid.

Popis uplatnění

Metodika je určena:

Firmám zabývajícím se poradenstvím a konzultacemi v oblasti chovatelského a plemenářského managementu v malých i velkých farmách v ČR.

Chovatelům, kterým výsledky z laboratoří umožní analyzovat stav stáda z pohledu výskytu subklinických mastitid.

Laboratořím provádějícím pro chovatele analýzy hospodářských zvířat k rozšíření nabídky jejich služeb o testy mastitidních patogenů.

Akreditovaným laboratořím svazu chovatelů provádějícím rozboru mléka (LRM).

Ekonomické aspekty

Předpokládané ekonomické přínosy jsou v rozšíření nabídky portfolia služeb pro chovatele v ČR poskytovné poradenskými firmami nebo laboratořemi. Jsou závislé na počtu analyzovaných vzorků. Kvalifikovaný odhad navýšení služeb pro laboratoře v blízkém horizontu je 500 analýz BTM ročně. Náklady reagensů na 500 analýz – 81 tis. Předpokládané zvýšení obrátu firmy za 500 BTM analýz – 400 tis. při kalkulovaném 10% zisku.

Náklady (reagencie) na detekci mastitidních patogenů s využitím nově navržených qPCR plexů

Pořizovací náklady reagensů nutných pro detekce mastitidních patogenů:

primery, sondy, univerzální kontrola (UCO) od firmy Generi Biotech, Hradec Králové
Xceed probe mastermix, Biotech a.s., Praha

qPCR duplex detekce *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus spp*

primery	0,50 Kč/reakce
sondy	12,60 Kč/reakce
UCO	18,40 Kč/reakce
Mastermix	12,50 Kč/reakce
<u>Celkem:</u>	<u>44 Kč/vzorek</u>

qPCR duplex detekce *Streptococcus dysgalactiae* a *Streptococcus uberis*

primery	0,50 Kč/reakce
sondy	16,40 Kč/reakce
UCO	18,40 Kč/reakce
Mastermix	12,50 Kč/reakce
<u>Celkem:</u>	<u>47,80 Kč/vzorek</u>

qPCR detekce *Streptococcus agalactiae*

primery	0,30 Kč/reakce
sonda	4,80 Kč/reakce
UCO	18,40 Kč/reakce
Mastermix	12,50 Kč/reakce
<u>Celkem:</u>	<u>36 Kč/vzorek</u>

qPCR detekce *Mycoplasma bovis*

primery	0,10 Kč/reakce
sonda	3,80 Kč/reakce
UCO	18,40 Kč/reakce
Mastermix	12,50 Kč/reakce
<u>Celkem:</u>	<u>34,80 Kč/vzorek</u>

Cena reagensií pro qPCR detekci 6 mastitidních patogenů je 163,- Kč na jeden vzorek mléka nebo mleziva.

Pro srovnání uvádíme ceny reagensií ve světě používaného systému PathoProof Mastitis PCR assay.

12-Complete Pathoproof Mastitis PCR assay (zahrnující 12 mikroorganismů) – cena 390,- Kč na vzorek.

3-Major PathoProof Mastitis PCR assay (zahrnující detekci 3 mikroorganismů *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* a *Mycoplasma bovis*) – cena 340,- Kč na vzorek.

Seznam použité související literatury

Dmitrev A., Bhide M., Mikula I. 2006: *Cpn60* gene based multiplex-PCR assay for simultaneous identification of streptococcal species. *Acta Veterinaria Brno*. 75:235-240.

Gillespie B.E. and Oliver S.P. 2005: Simultaneous detection of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus uberis* in milk by multiplex real-time polymerase chain reaction. *Journal of Dairy Science*. 88:3510-3518.

Kilic A., Muldrew K.L., Tang Y.-W., Basustaoglu A.C. 2010. Triplex real-time polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci and determination of methicillin resistance directly from positive blood culture bottles. *Diagn Microbiol Inf Dis* 66:349–355

Koskinen M.T., Holopainen J., Pyörälä S., Bredbacka P., Pitkälä A., Barkema H.W., Bexiga R., Roberson J., Solverod L., Piccinini R., Kelton D., Lehmusto H., Niskala S., Salmikivi L., 2009: Analytical specificity and sensitivity of a real-time PCR assay for identification of bovine mastitis pathogens. *J. Dairy Sci*. 92:952– 959.

Phuektes P., Browning G.R., Anderson G., Mansell P.D. 2003: Multiplex polymerase chain reaction as a mastitis screening test for *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus uberis*. *Journal of Dairy Research*. 70:149-155.

Phuektes P., Mansell P.d., Browning G.F. 2001: Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and streptococcal causes of bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*. 84: 1140-1148.

Sachse K., Salam H.S.H., Diller R., Schubert E., Hoffmann B., Hotzel H. 2010. Use of a novel real-time PCR technique to monitor and quantitate *Mycoplasma bovis* infection in cattle herds with mastitis and respiratory disease. *Vet J* 186:299–303.

Shome BR, Das Mitra S, Bhuvana M, Krithiga N, Velu D, Shome R, Isloor S, Barbuddhe SB, Rahman H. 2011: Multiplex PCR assay for species identification of bovine mastitis pathogens. *Journal of Applied Microbiology*. 111, 1349–1356.

Zanardi G., Caminiti A., Delle Donne G., Moroni P., Santi A., Galletti G., Tamba M., Bolzoni G., Bertocchi L., 2014: Comparing real-time PCR and bacteriological cultures for *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* in bulk-tank milk samples. *J. Dairy Sci*. 97(9):5592-8

Seznam publikací, které předcházely metodice

Červinková D., Vlková H., Borodacová I., Makovcová J., Babak V., Lorencová A., Vrtková I., Marosevic D., Jaglic Z. 2013: Prevalence of mastitis pathogens in milk from clinically healthy cows. Veterinární medicína. sv. 58, č. 11, s. 567--575. ISSN 0375-8427. (dedikace MZe ČR QJ1210301, MZe 0002716202, MŠMT ČR cz 1.05/2.1.00/01/0006-ED 0006/01/01)

Surýnek J., Knoll A., Vrtková I. 2014: Development of rapid and sensitive quantitative PCR-based method for major bovine mastitis pathogens identification, XXVI. International Conference Genetic Days, Book of Abstracts 210-212. ISBN 978-80-213-2473-2. (dedikace MZe ČR QJ1210301, IGA IP 13/2014, CEITEC CZ.1.05/1.1.00/02.0068)

Surynek, J., Knoll, A., Vrtkova, I. 2014: Construction of multiplex quantitative PCR for detection of streptococcal mastitis. Proceed. Inter.PhD Conf., Brno, 4p. (dedikace MZe ČR QJ1210301, IGA IP13/2014, CEITEC CZ.1.05/1.1.00/02.0068)

Surýnek, J., Vrtková, I., Knoll, A. 2016: Mycoplasma bovis was not detected in milk from dairy cattle in the Czech Republic. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. 64, 165-168 (dedikace MZe ČR QJ1210301, IGA IP13/2014, CEITEC CZ. 1.05/1.1.00/02.0068)

Vrtková I.: Pilotní výzkum detekce mastitidních patogenů real time PCR v chovech v ČR, Mlékařské listy - Zpravodaj. 2013. sv. 23 č. 141, s. 1-5. ISSN 1212-950X. (dedikace MZe ČR QJ1210301)

Vrtková I.: Boj proti mastitidám pomocí DNA testů – informační materiály pro chovatelskou a odbornou veřejnost, 2013. Dáváno k dispozici na setkáních chovatelů, pro studenty Mgr. a PhD. zootechniků volně k dispozici na chodbě řešitelského pracoviště. (dedikace MZe ČR QJ1210301)

Vrtková I., 2014: Stanovení DNA mastitidních patogenů v mléce. Prezentace na semináři Dny prvovýroby mléka 2014, Hustopeče u Brna (dedikace MZe ČR QJ1210301)

Vrtková, I. 2014: Postupy k využívání DNA testů při určování mastitidních patogenů v mléce dojníc. Certifikovaná metodika. (dedikace k projektu MZe ČR č. Qj1210301)