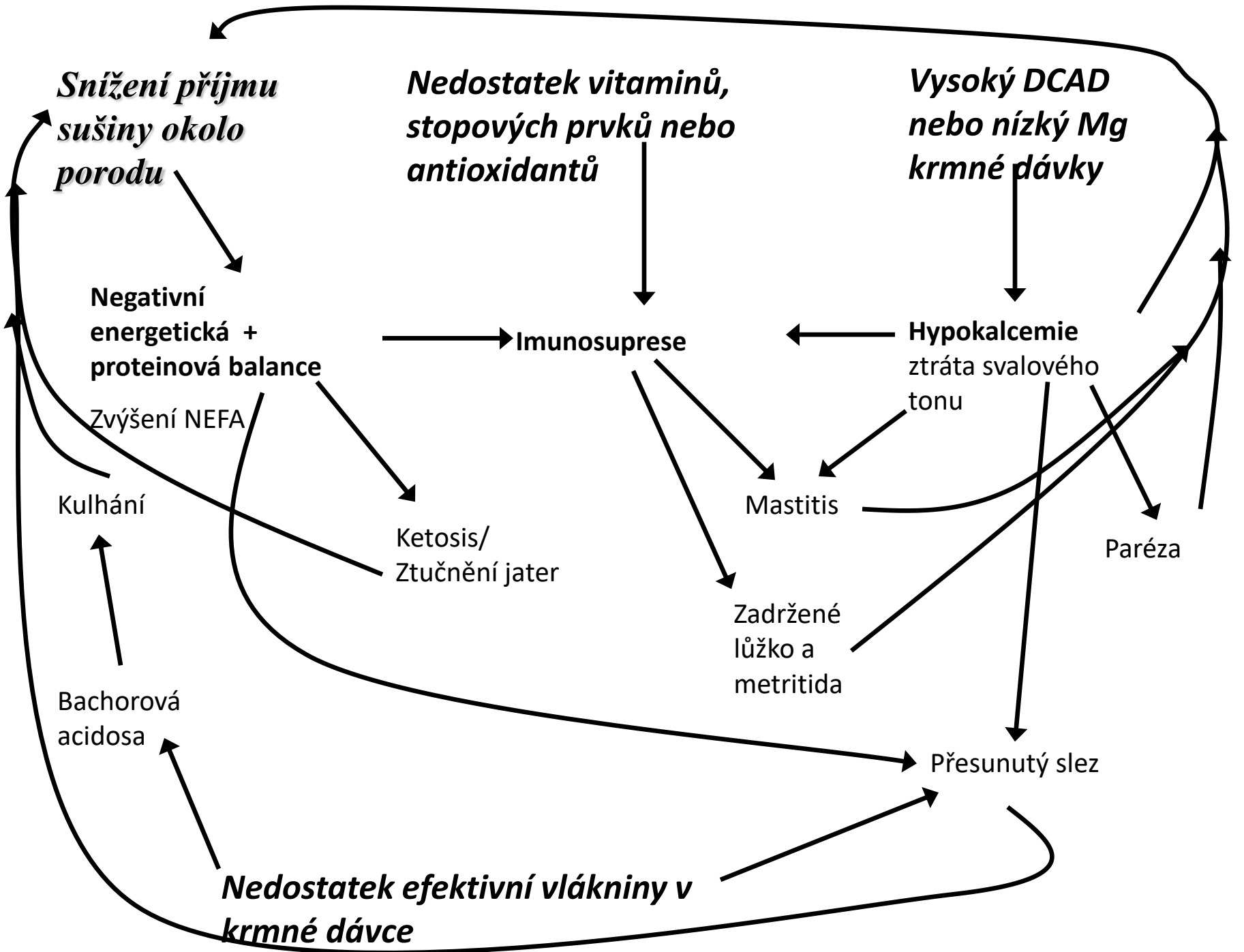


Metritida a imunita

Jesse Goff DVM, PhD
Anderson Chair in Veterinary Medicine
Iowa State University
Ames, IA

jpgoff@iastate.edu



Imunosuprese okolo porodu

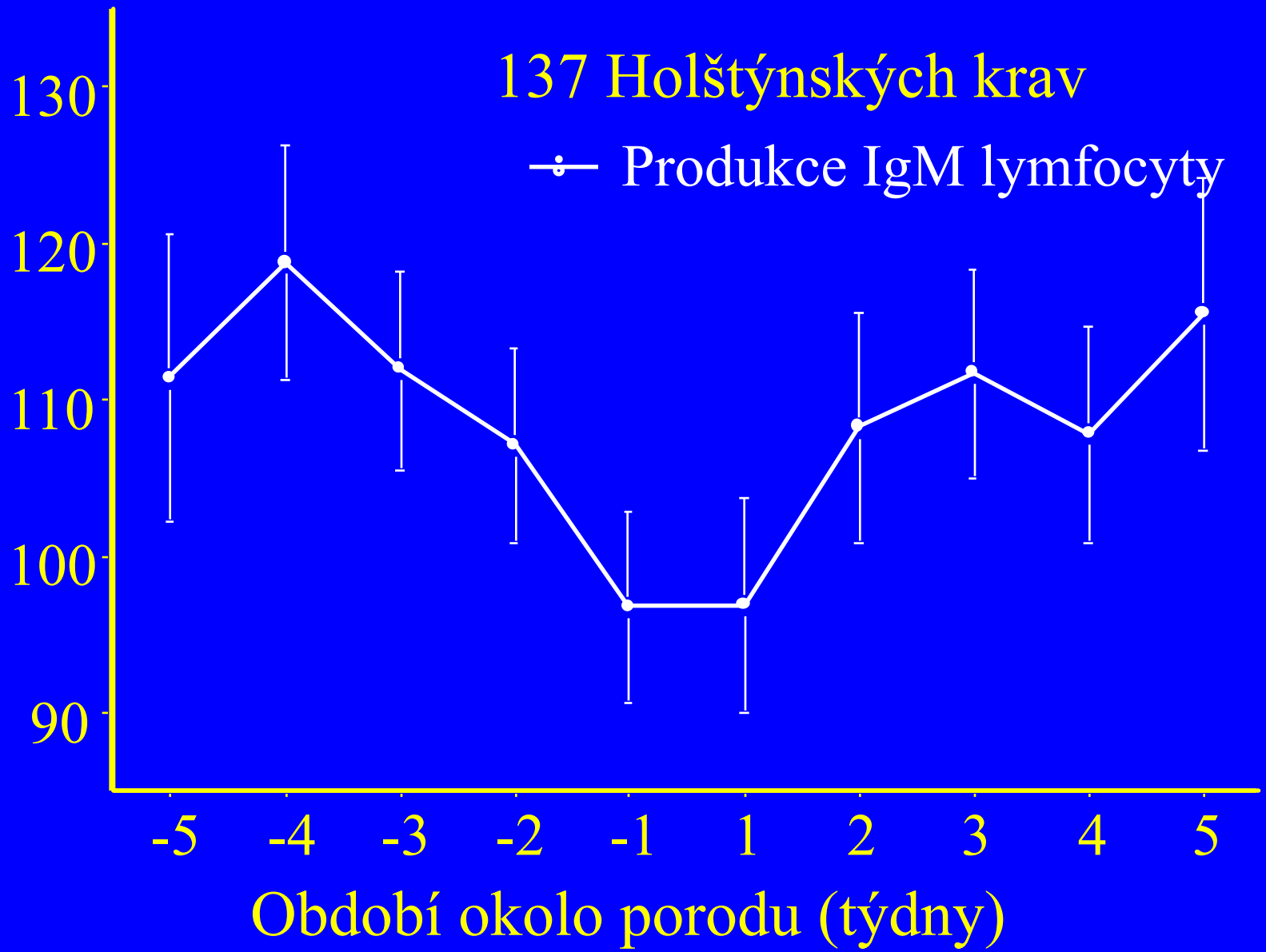
1. Vysoký výskyt mastitid. 25% případů koliformních mastitid se vyskytne v prvních týdnech laktace.
2. Klinická manifestace chronických onemocnění; paratuberkulóza, salmonelóza po porodu.
3. ZADRŽENÉ LŮŽKO, METRITIDA, ENDOMETRITIDA Z DŮVODU ŠPATNÉ FUNKCE IMUNITY!!

Guidry, et al. 1976. *Am J Vet Res.* 37:1195; Newbould. 1976. *Can J Comp Med.* 40:111; Wells, et al. 1977. *Clin Exp Immunol.* 29:159; Hill. 1981. *Res Vet Sci.* 31:107; Manak. 1982. *J Reprod Immunol.* 4:263; Kashiwazaki, et al. 1985. *Jpn J Vet Sci.* 47:337; Ishikawa. 1987. *Jpn J Vet Sci.* 49:469.

137 Holštýnských krav

—●— Produkce IgM lymfocyty

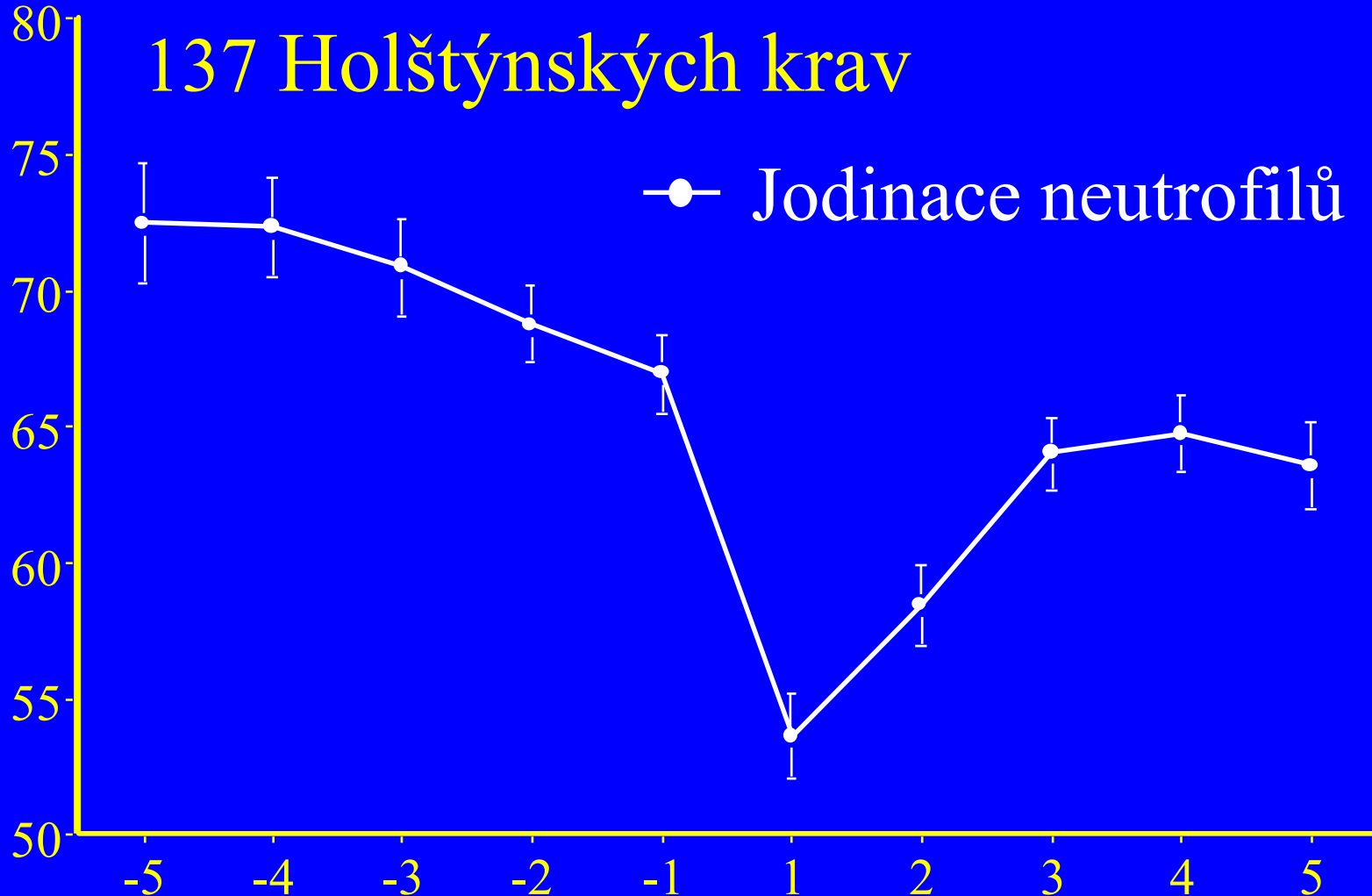
Procento laboratorních standardů



Procento laboratorních standardů

137 Holštýnských krav

● Jodinace neutrofilů



Období okolo porodu (týdny)

Detilleux et al., 1995

Velké metabolické výzvy, kterým čelí krávy v přechodném období

1. Negativní energetická balance
2. Nevyváženost metabolismu minerálů (Ca, P, Mg, stopové prvky)
3. Vyčerpání vitaminů

Vliv ketosy na funkci buněk imunitního systému

1. Tuková infiltrace jater může snížit proteiny akutní fáze
2. Neschopnost produkce glukosy nezbytné jako palivo pro imunitní odpověď.
3. Ketolátky, volné mastné kyseliny v krvi

Produkce interferonu imunitními buňkami izolovanými od krav v různých stádiích energetické balance.

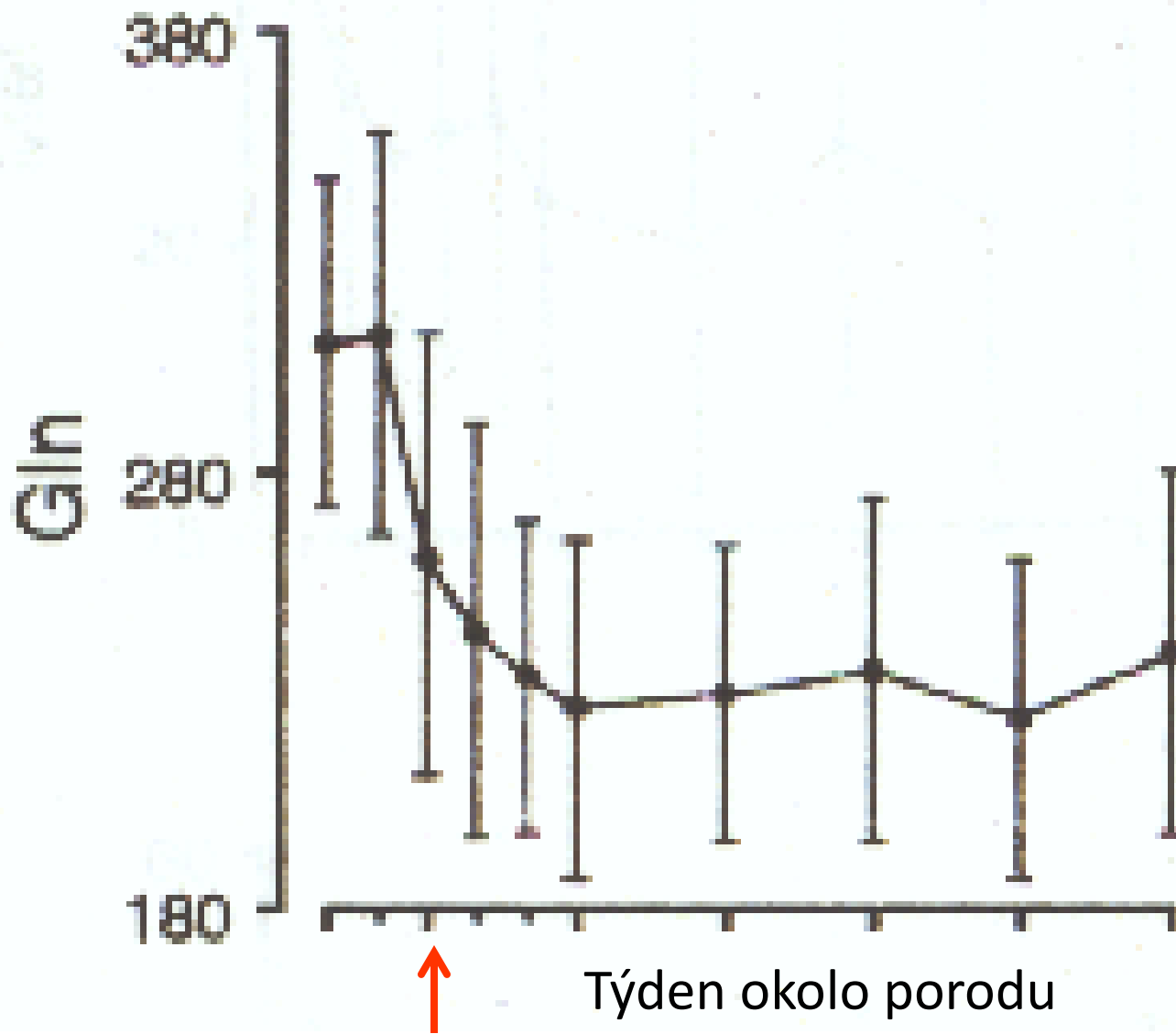
Buňky stimulovány virem New Castle's Disease

	<u>NDV</u>
Normální krávy	980 _± 400
Subklinická ketosa	210 _± 55
Ketosa	84 _± 32

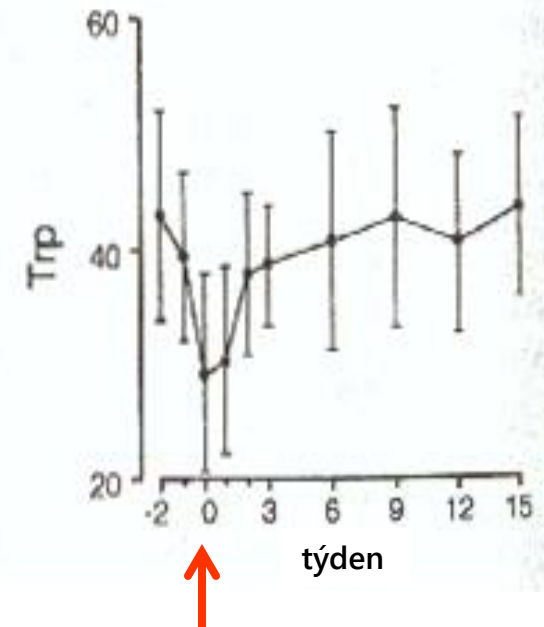
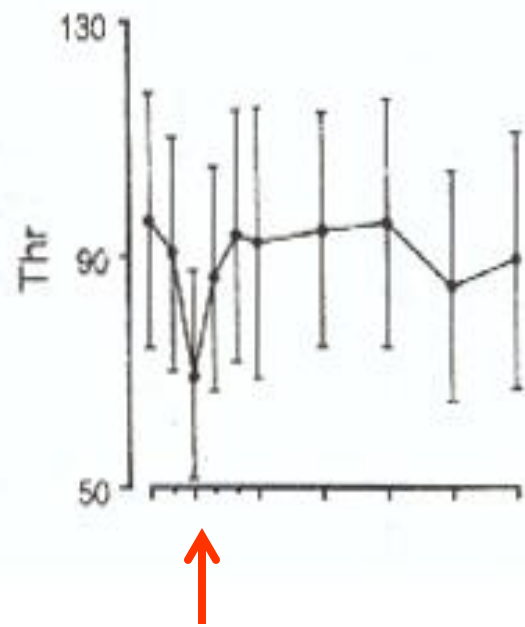
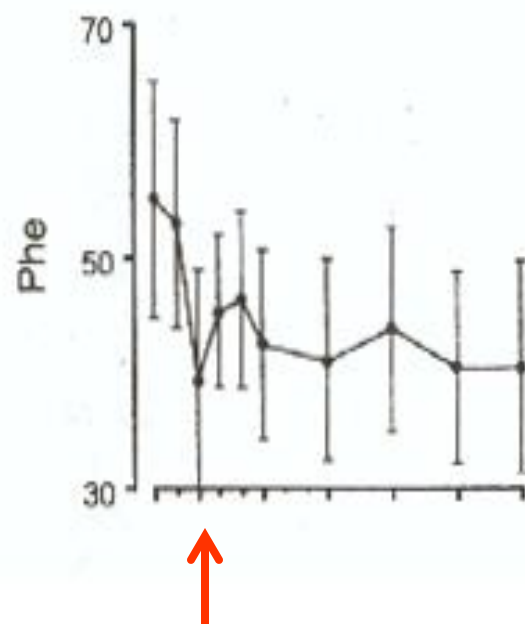
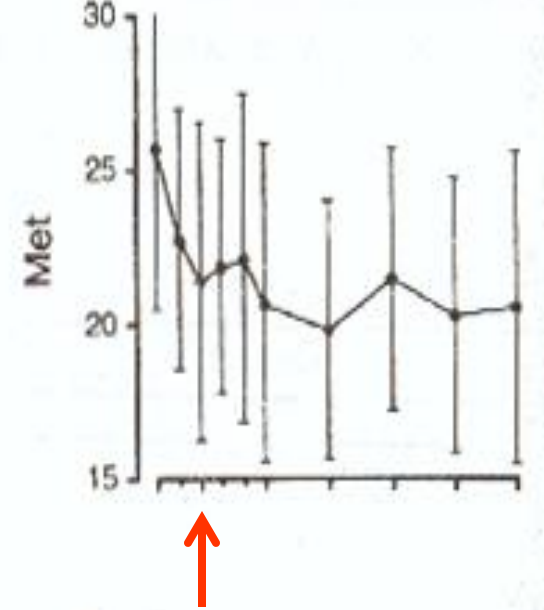
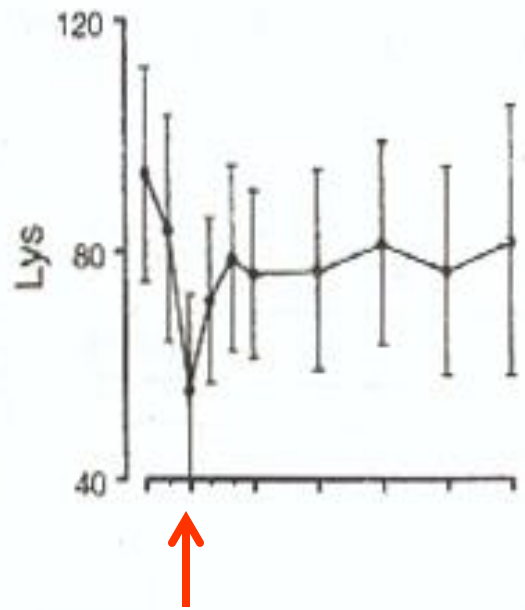
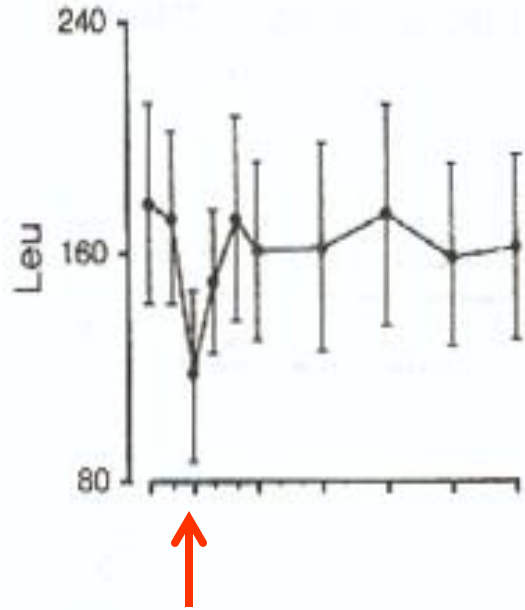
Kandfer-Szersen, et al., 1992

Negativní proteinová balance??

- trvá 2-4 týdny na začátku laktace
- Glutamin je hlavním zdrojem energie pro mnohé tělesné tkáně
 - zvláště imunitní buňky.



Meijer et al., 1995



týden

Meijer et al., 1995

Zajištění energetické a proteinové balance

Energie

Krmná dávka s vysokým podílem slámy udržuje krávy hladové?

Zbavte se tlustých krav ??

Nálevy propylenglykolem nebo glycerinem?

Aditiva (kvasinky, cholin, niacin, vitaminy B ??)

Protein

Ujistěte se že krávy dostávají dostatek MP

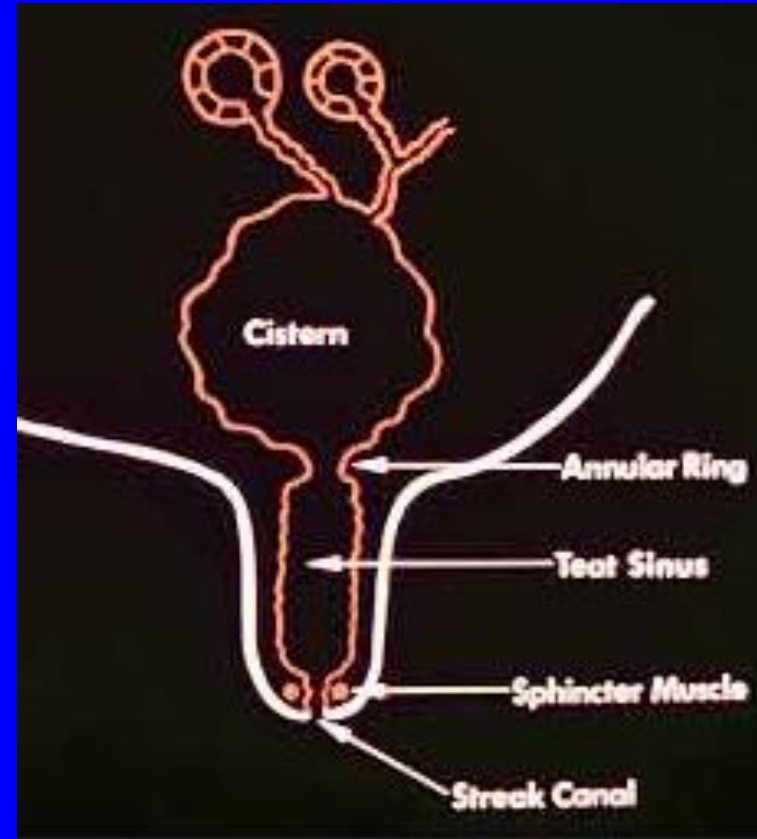
Použijte methionin a lysin chráněný v bachoru

VLIV HYPOKALCEMIE A POPORODNÍ PARÉZY NA ODOLNOST VŮČI ONEMOCNĚNÍ

1. Snížený příjem krmiva → zhoršení negativní energetická balance

2. Nedostatečné svalové kontrakce

- zhoršují uzavření strukového svěrače
- nedostatečné vypuzení děložního obsahu po otelení



3. Snížení odpovědi imunitních buněk na podněty

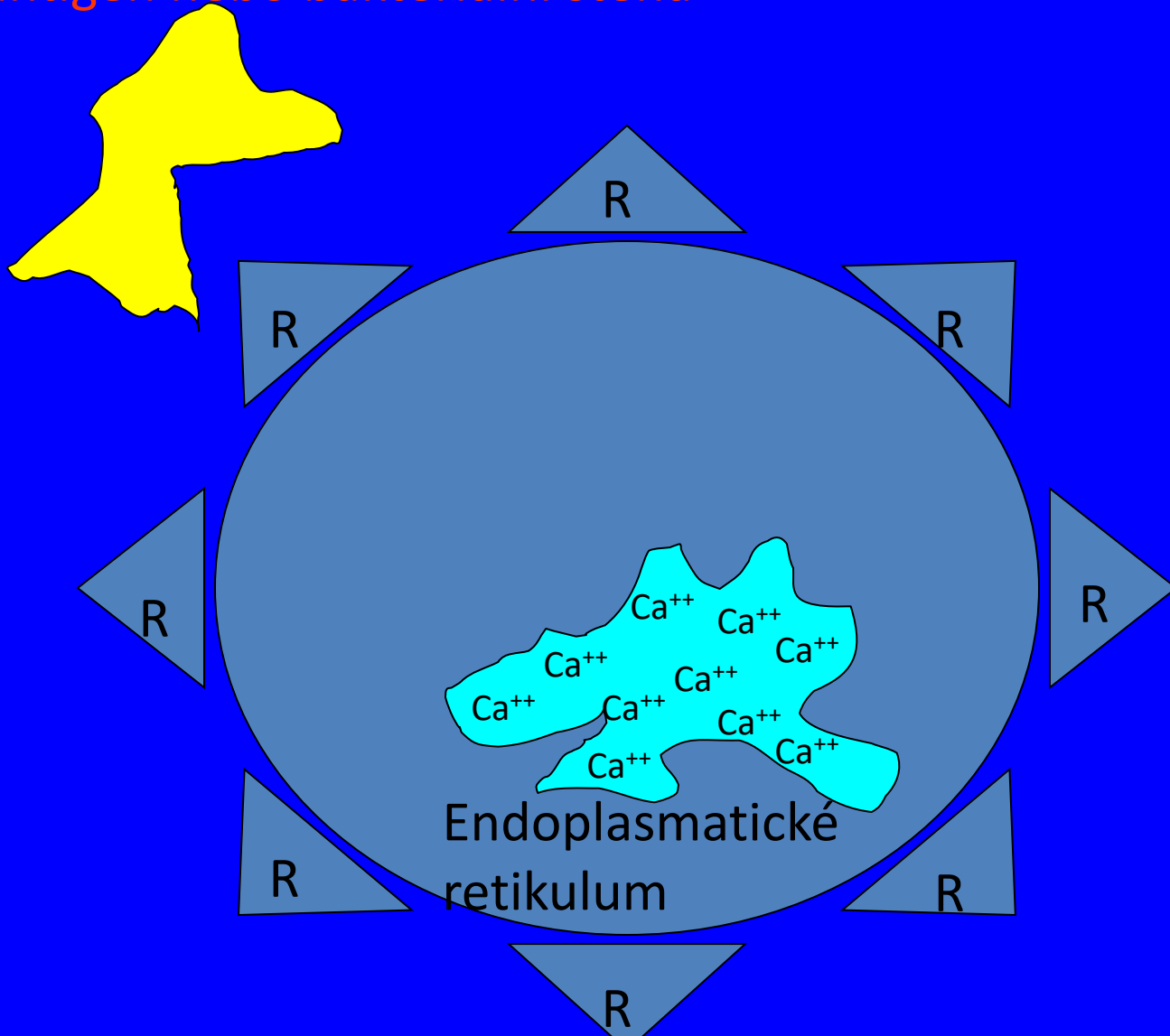
- vápník je „druhý posel“ imunitních buněk

VLIV HYPOKALCEMIE A POPORODNÍ PARÉZY NA ODOLNOST VŮČI ONEMOCNĚNÍ

1. Snížení příjmu krmiva → zhoršení negativní energetické balance
2. Nedostatečné svalové kontrakce
 - zhoršují uzavření strukového svěrače
 - nedostatečné vypuzení obsahu děložního po otelení
3. Snížení odpovědi imunitních buněk na podněty
 - vápník je „druhý posel“ imunitních buněk

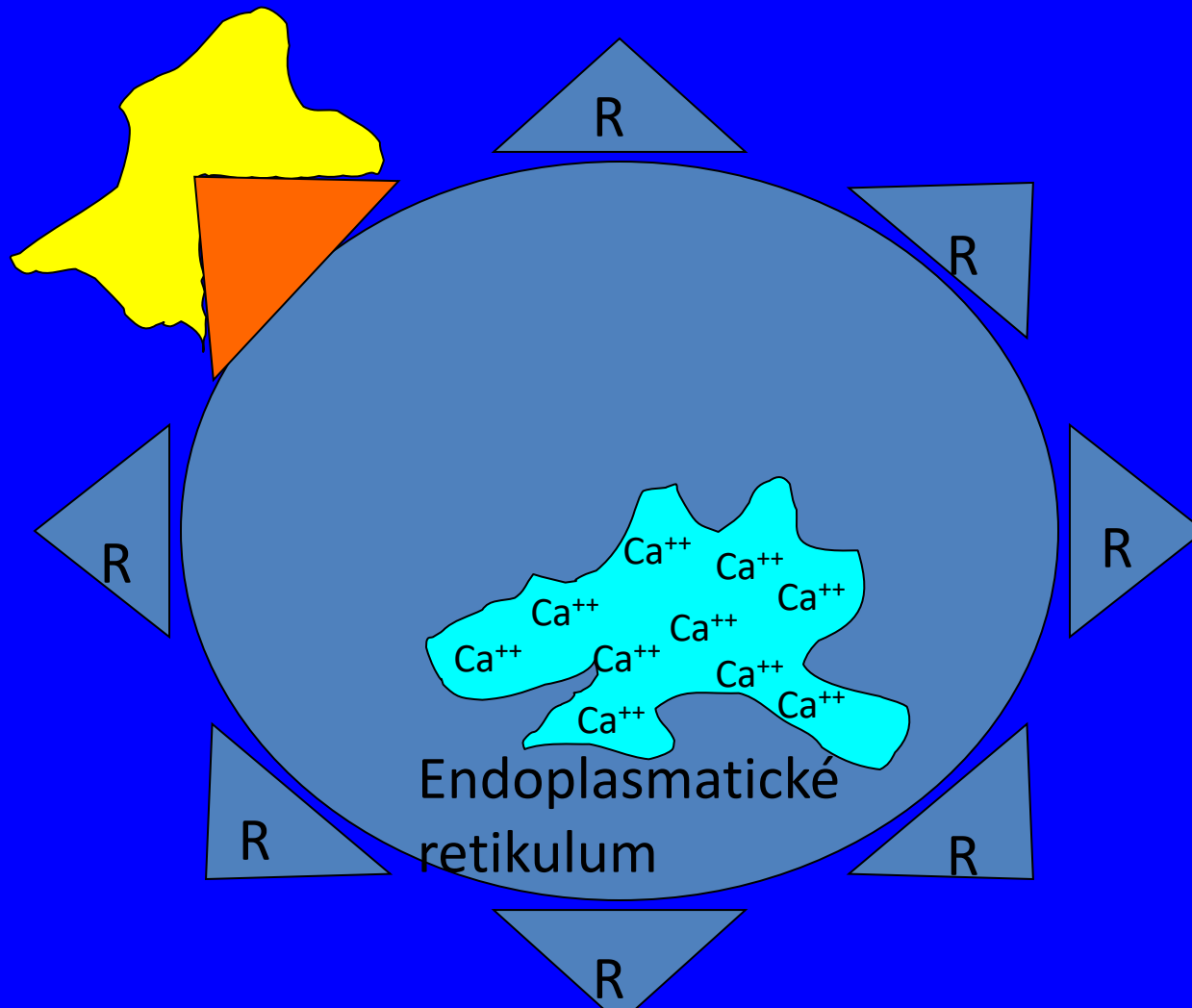
Normální aktivace lymfocytu

Cytokin, antigen nebo bakteriální stěna



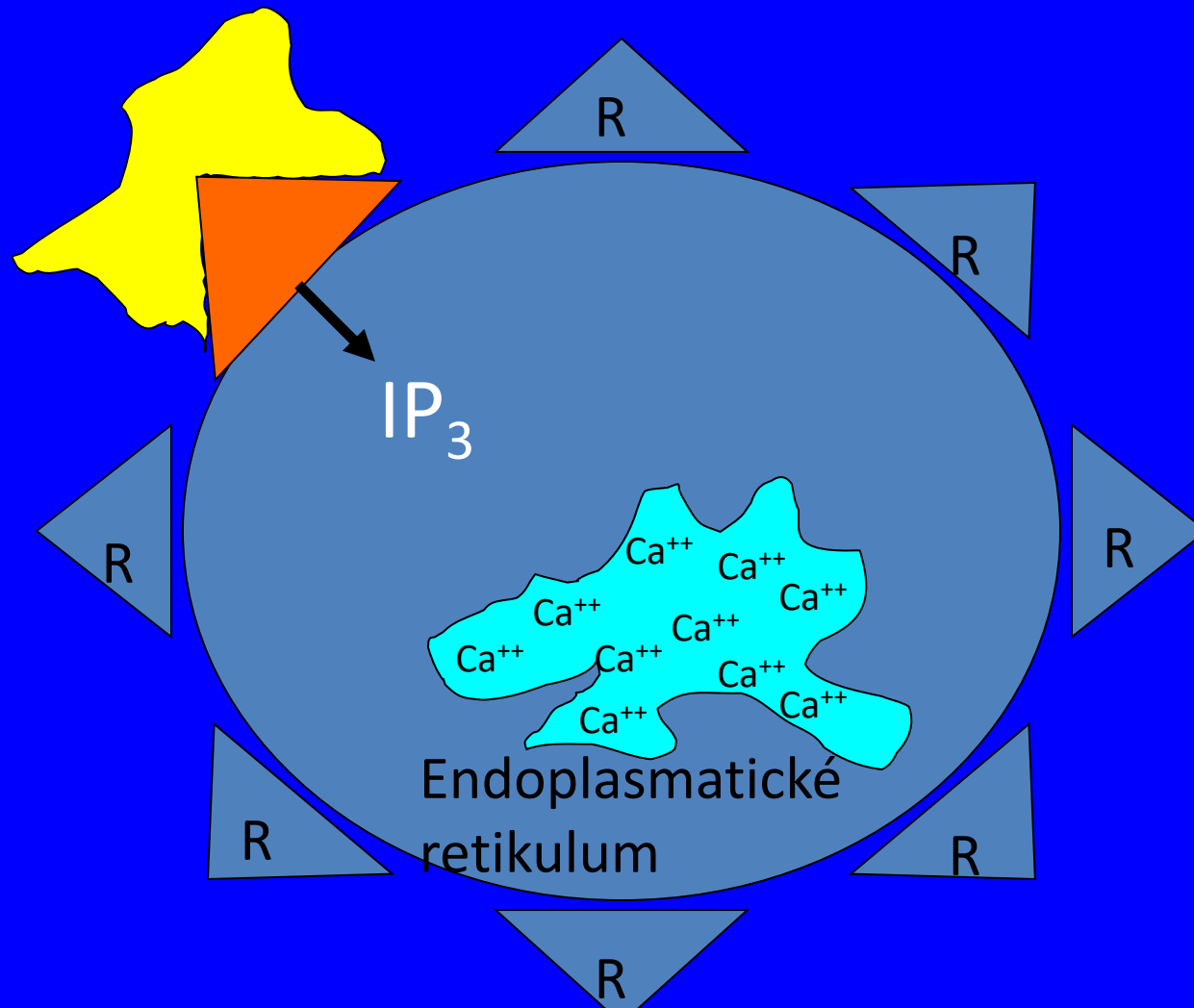
Normální aktivace lymfocytu

Cytokin, antigen nebo bakteriální stěna



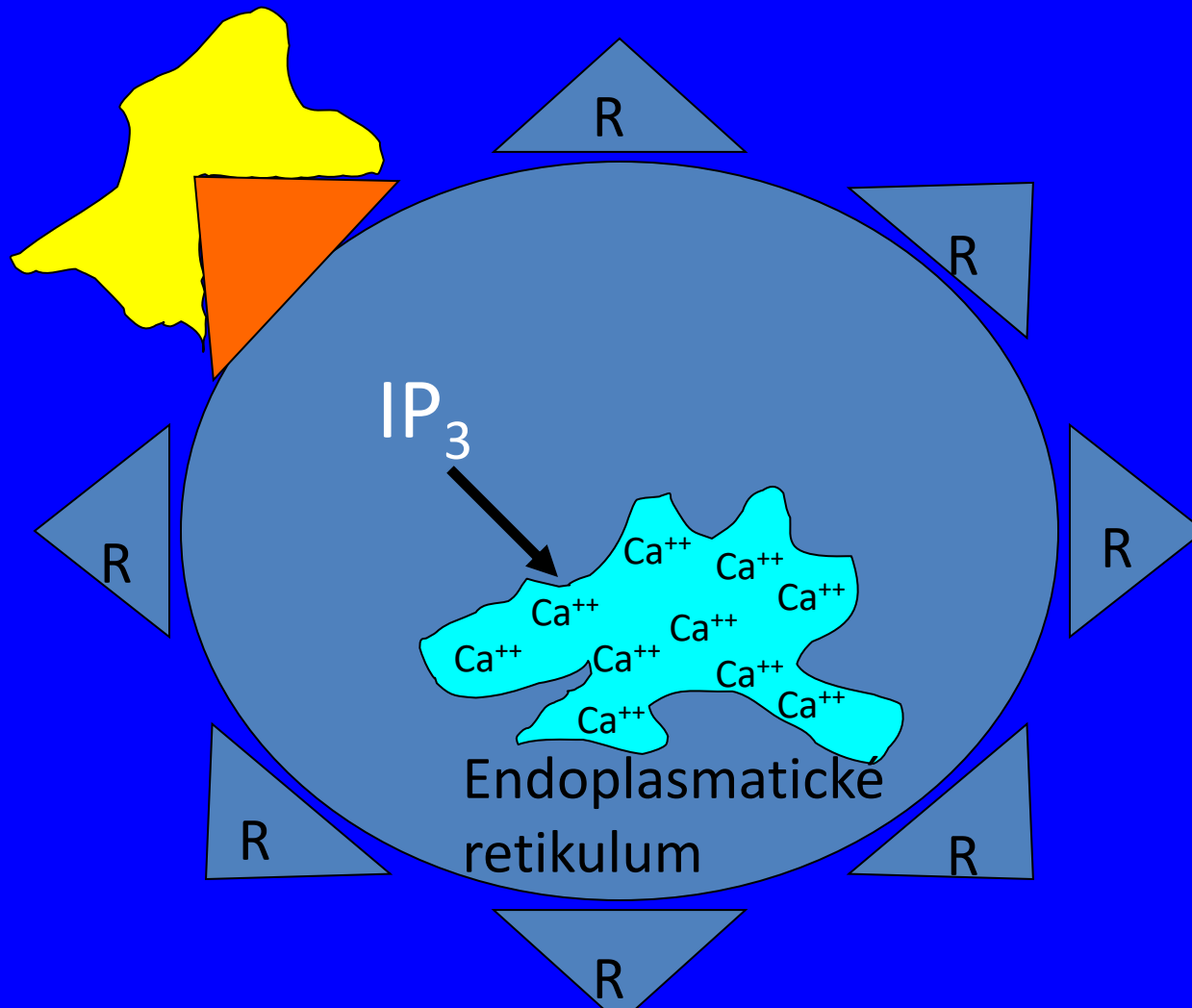
Normální aktivace lymfocytu

Cytokin, antigen nebo bakteriální stěna



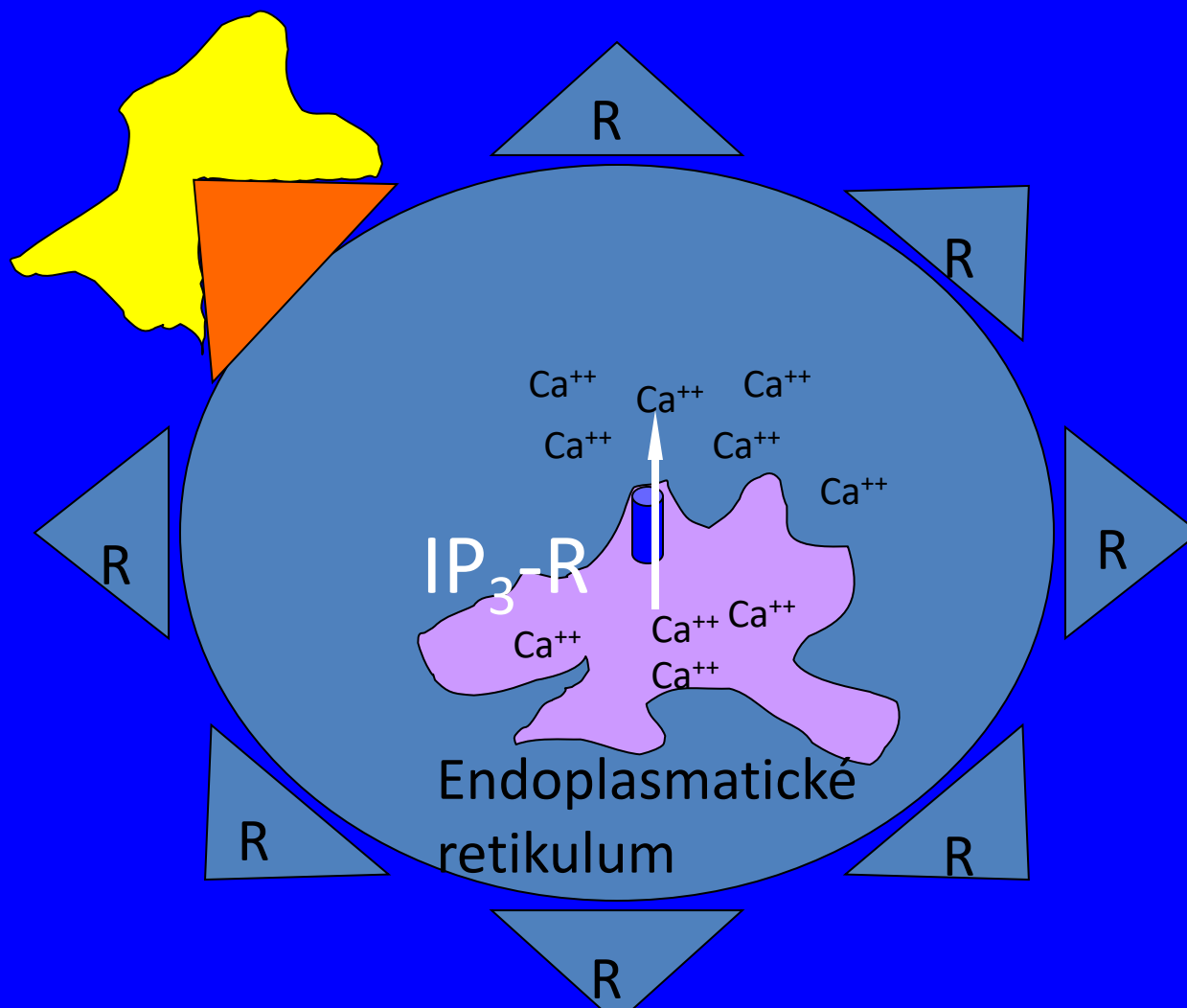
Normální aktivace lymfocytu

Cytokin, antigen nebo bakteriální stěna



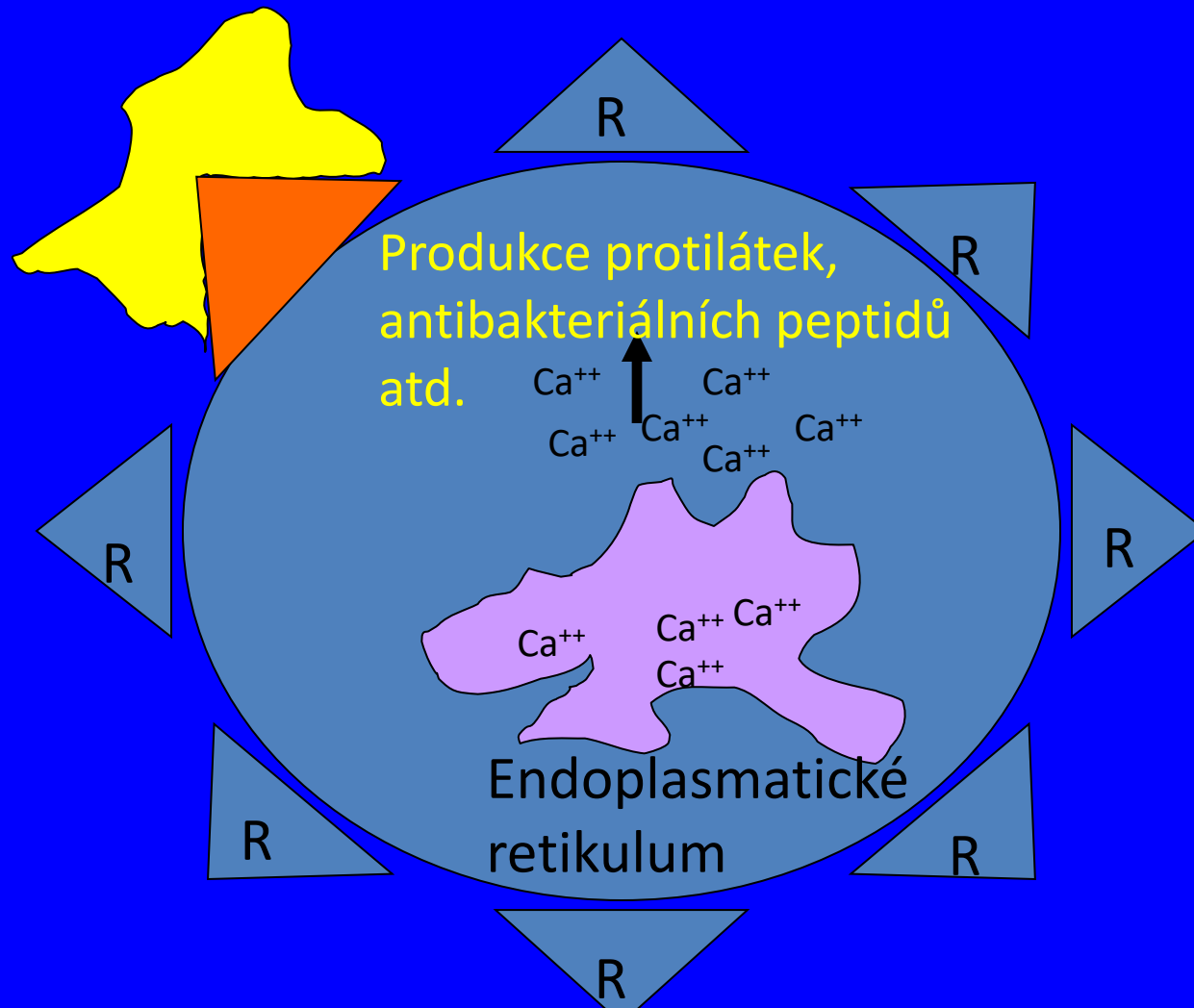
Normal Lymphocyte activation

Cytokin, antigen nebo bakteriální stěna



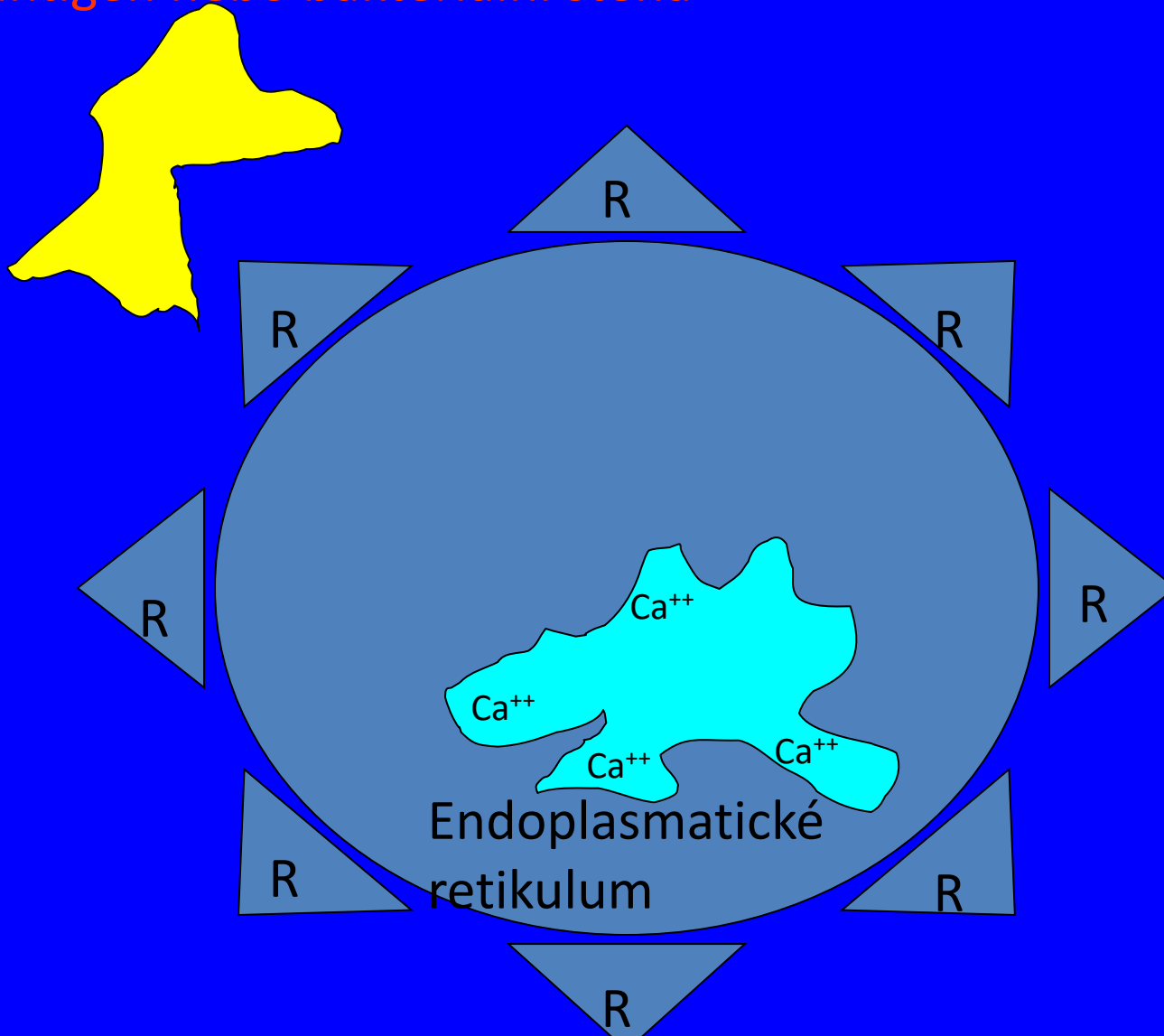
Normální aktivace lymfocytu

Cytokin, antigen nebo bakteriální stěna



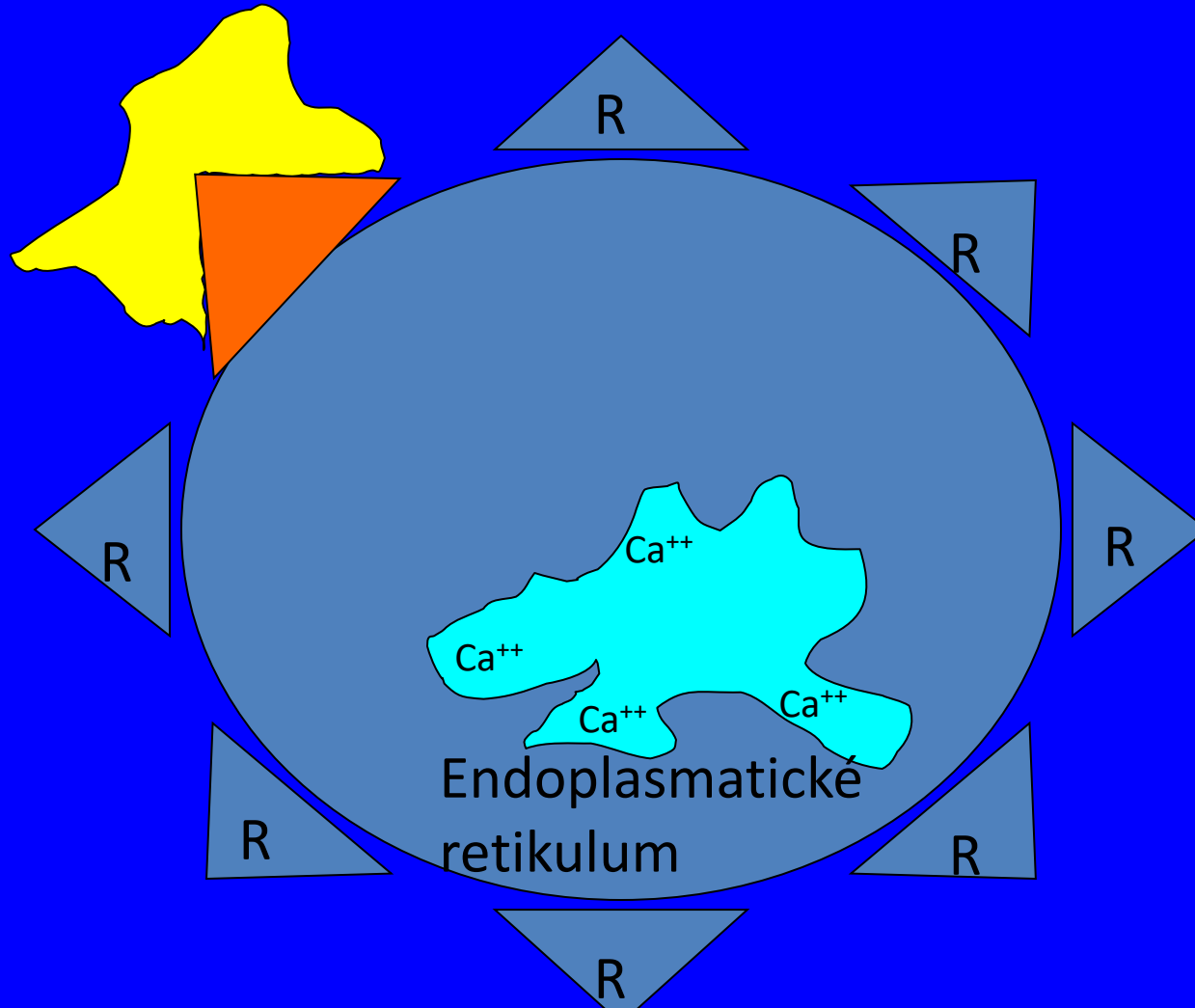
Aktivace lymfocytu při hypokalciemii

Cytokin, antigen nebo bakteriální stěna



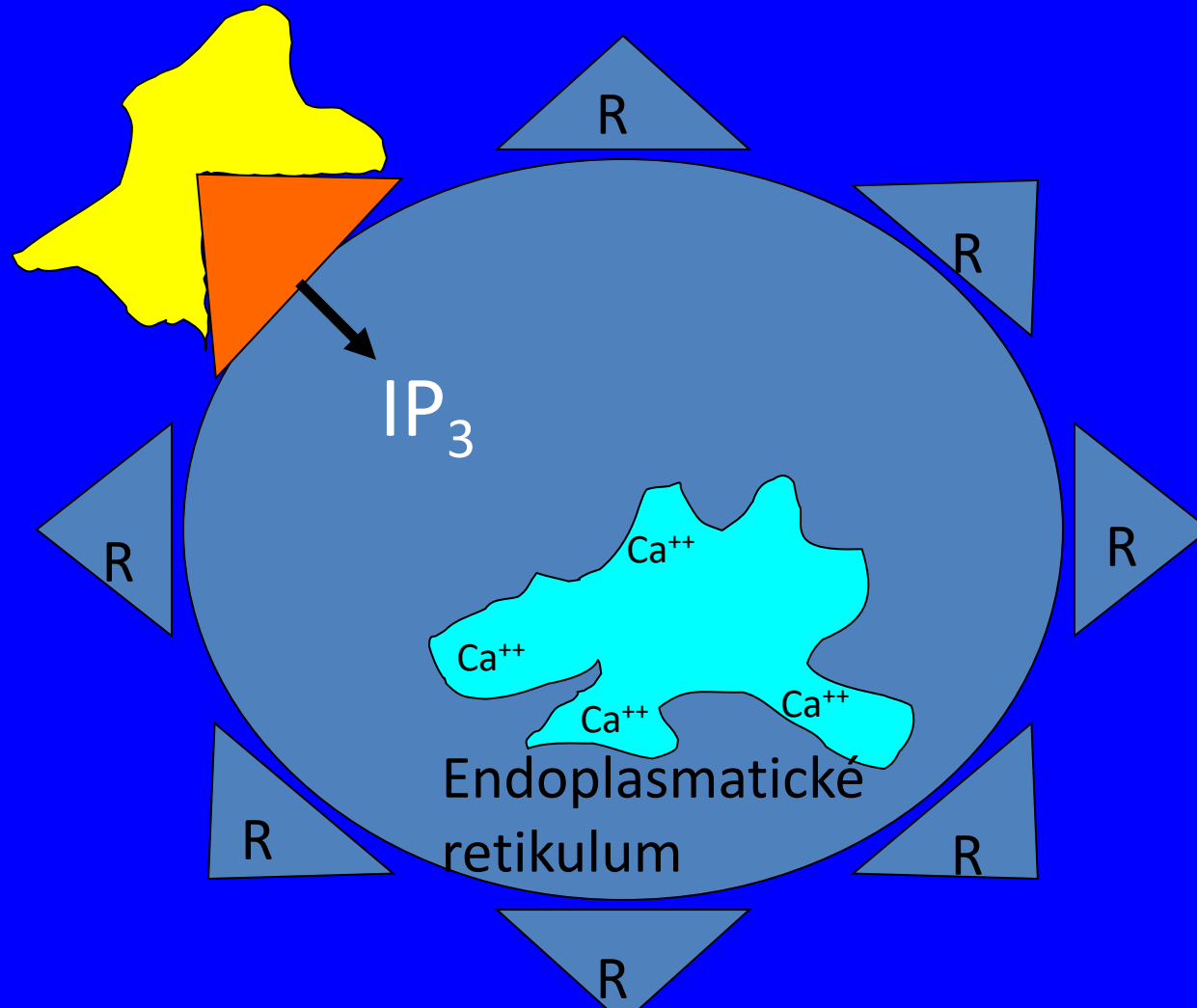
Aktivace lymfocytu při hypokalciemii

Cytokin, antigen nebo bakteriální stěna



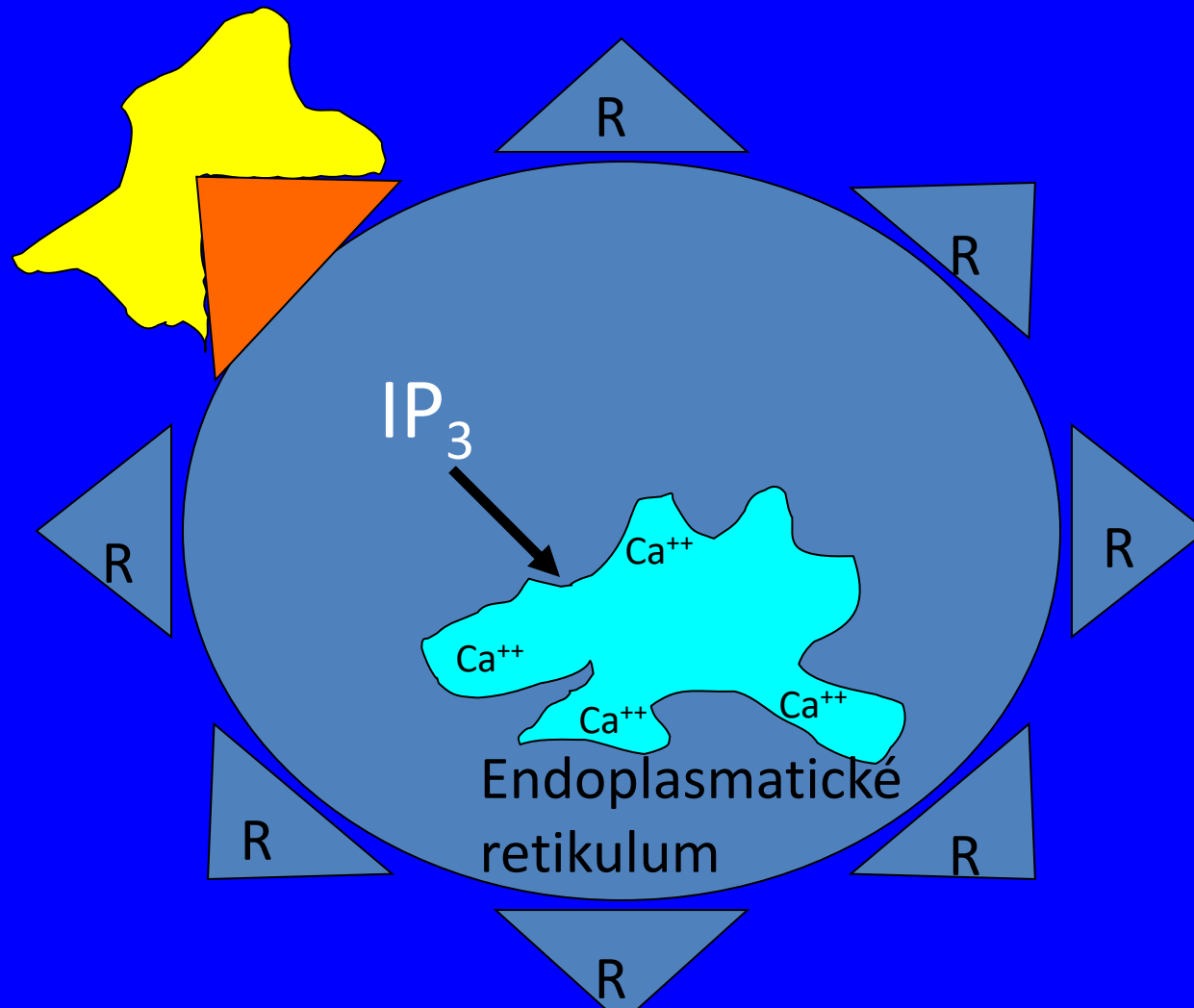
Aktivace lymfocytu při hypokalciemii

Cytokin, antigen nebo bakteriální stěna



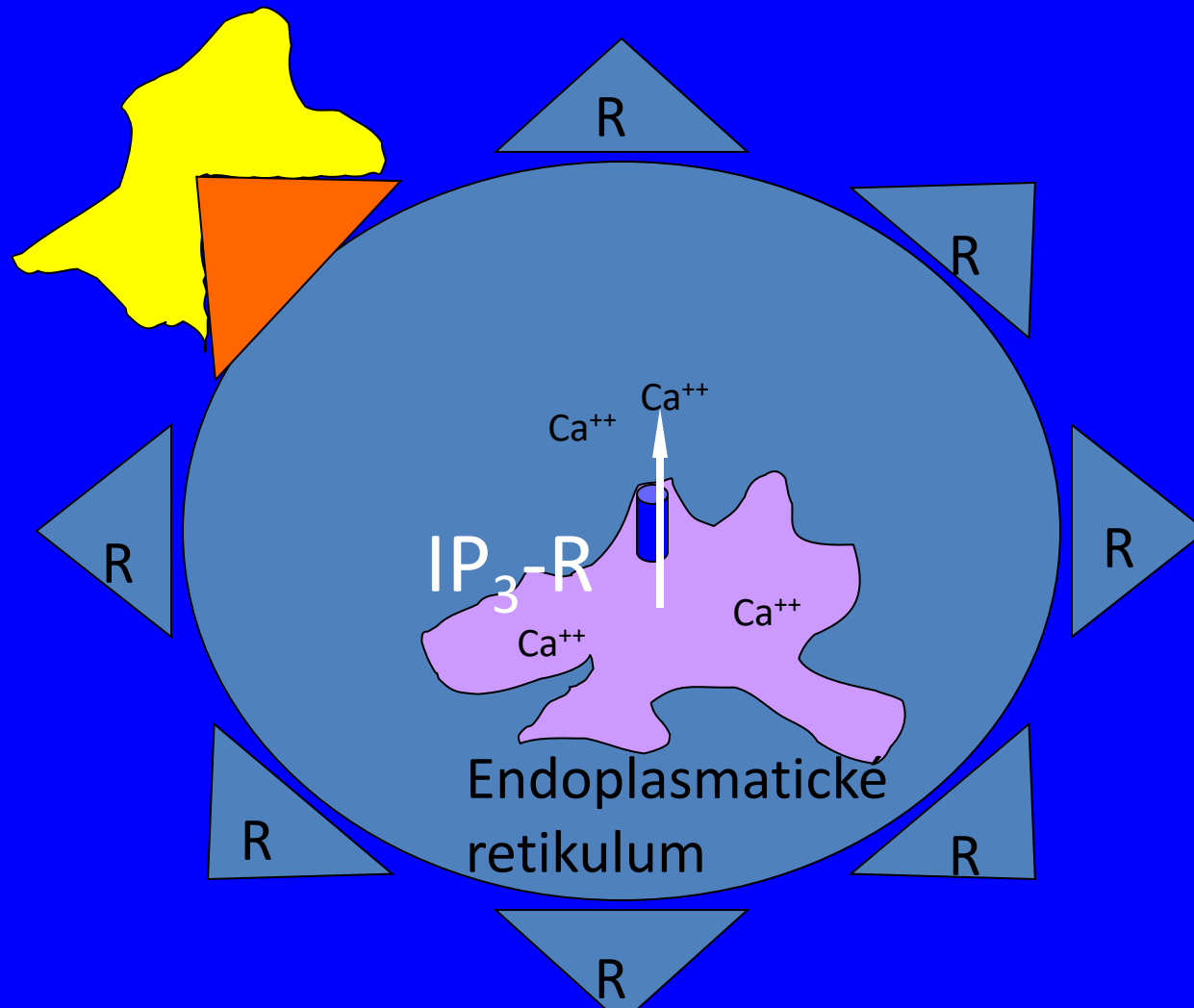
Aktivace lymfocytu při hypokalciemii

Cytokin, antigen nebo bakteriální stěna



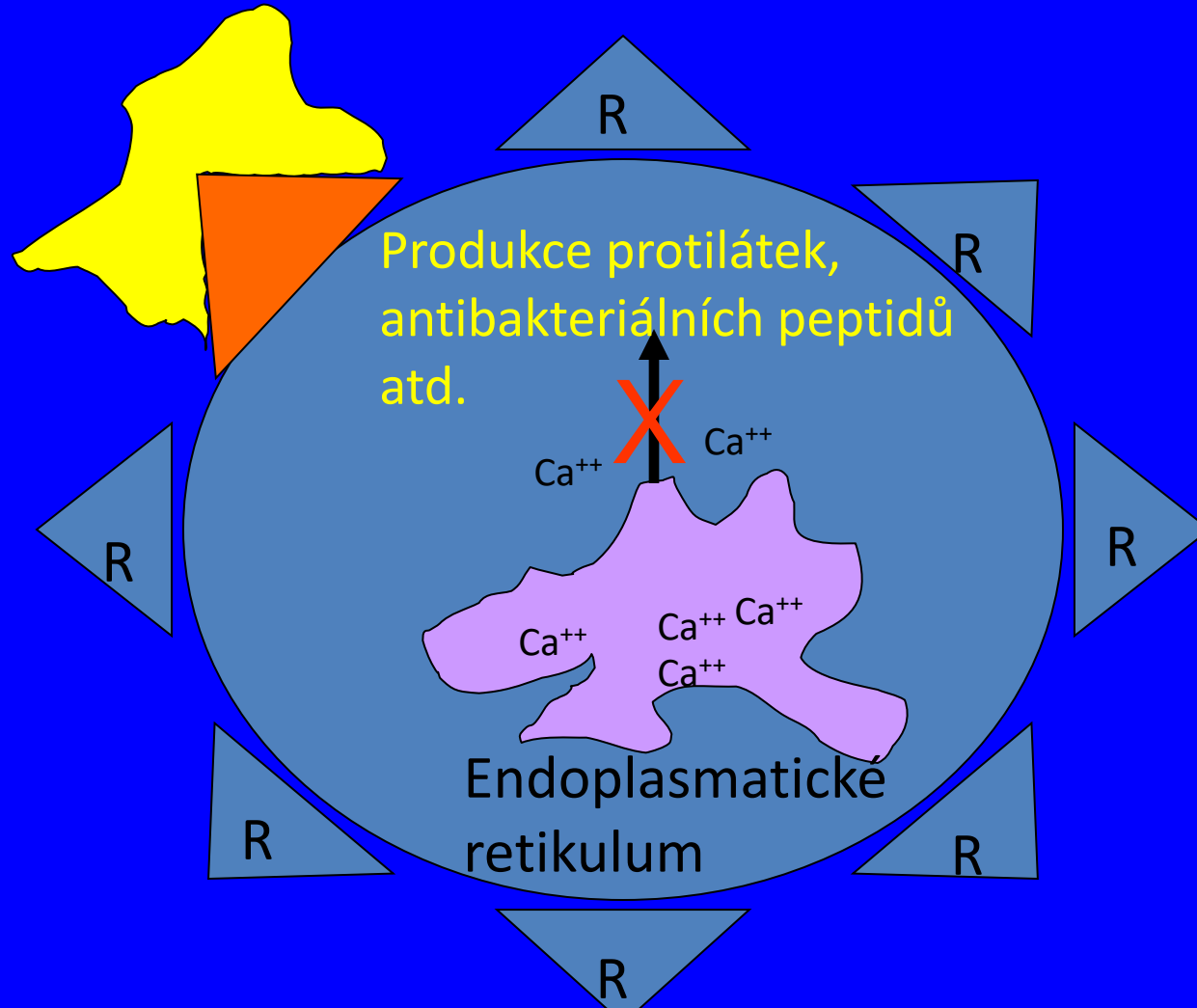
Aktivace lymfocytu při hypokalciemii

Cytokin, antigen nebo bakteriální stěna



Aktivace lymfocytu při hypokalciemii

Cytokin, antigen nebo bakteriální stěna



Normální krávy

– krček zůstává otevřený po 1 týden od otelení.

Lochie přítomné po 15 až 20 dní- červeno hnědá tekutina až žlutobílý hlenovitý výtok

Průměr děložního rohu 25.- 30. den je 3-4 cm, průměr krčku <5 cm 40. den

Involute dělohy a krčku je prakticky dokončená po 50 dnech.

První ovulace 17-22 dní po otelení.

Metritis – zánět uvnitř děložní stěny- obvykle se vyskytuje v prvních 2 týdnech po otelení.
Páchnoucí hnědý hnisavý výtok. Přibližně 50% postižených krav NEMÁ horečku.

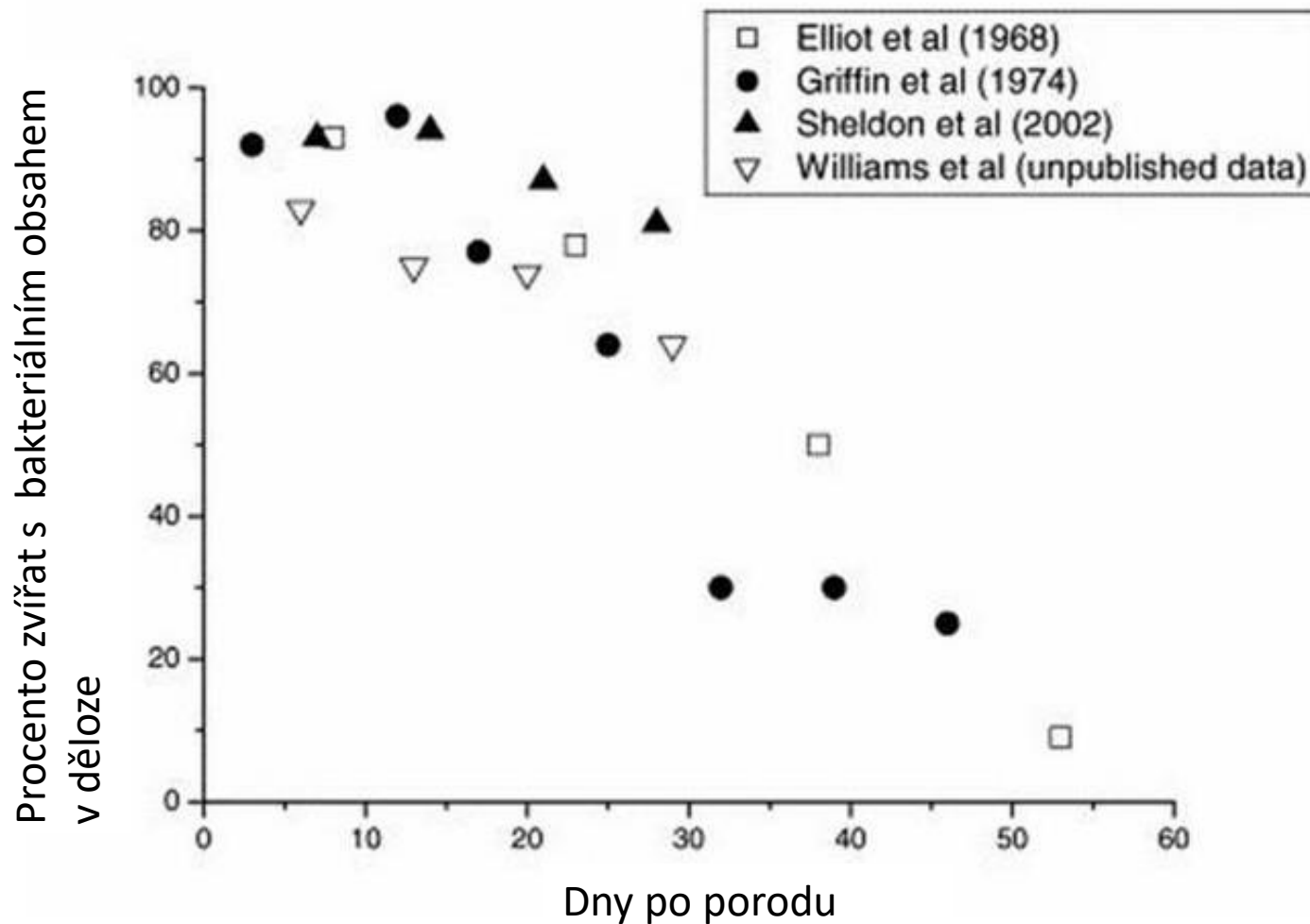
Endometritis – zánět buněk výstelky dělohy.
Obvykle bývá diagnostikován déle než 4 týdny po otelení.

Vývoj děložní infekce

Při otelení- otevření krčku vytvoří cestu do sterilního prostředí dělohy

4 den po porodu –bakterie lze nalézt v dělohách téměř každé krávy . (Sheldon et al., 2004.)

Graf 1. Procento krav s pozitivním bakteriálním nálezem v závislosti na dnech laktace



Credit: Sheldon and Dobson (2004).

Zdravé krávy- Streptococcus spp., Staphylococcus spp., a Bacillus spp. jsou hlavní nálezy během prvních 10 dní laktace (DIM),

Krávy s metritidou- *Truparella pyogenes* (*T. pyogenes*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Fusobacterium necrophorum* (*F. necrophorum*), a *Prevotella melaninogenicus* (*P. melaninogenicus*) byly hlavními nálezy (Bonnett et al. 1991; Bondurant 1999; Huszenicza et al. 1999; Gilbert et al. 2007).

Endometritis (po 28 dnech) – *E.coli* otevírá cestu pro *Truparella pyogenes* (některé *Fusobacteria* a *Prevotella*) (Olson et al , 1984; Gilbert et al. 2007)

Čtyři hlavní bakterie pracují společně aby způsobily metritidu/endometritidu

T. pyogenes, *E. coli*, *F. necrophorum*, a *P. melaninogenicus* — pracují synergicky aby vyvolaly onemocnění dělohy (Griffin et al. 1974; Ruder et al. 1981; Bonnett et al. 1991).

(BoHV-4 – virová příčina metritidy)

1. *E. coli* může zvýšit citlivost endometria k následné infekci *T. pyogenes* (Olson et al. 1984; Gilbert et al. 2007; Williams et al. 2007).
2. *T. pyogenes* působí synergicky s *F. necrophorum* a *P. melaninogenicus* čímž zvyšují závažnost onemocnění dělohy (Griffin et al. 1974; Ruder et al. 1981; Bonnett et al. 1991).

E. coli uvolňuje lipopolysacharidy buněčné stěny (LPS) (Williams et al. 2008);

T. pyogenes produkuje na cholesterolu závislý cytotoxin pyolysin (Miller et al. 2007) a růstový faktor pro *F. necrophorum* (Sheldon and Dobson 2004);

F. necrophorum produkuje leukotoxin;

P. melaninogenicus produkuje látky inhibující fagocytosu (Sheldon and Dobson 2004).

Krávy s fungující imunitou

Velký průnik neutrofilů jako odpověď na první pronikající bakterie.

Imunitní systém přemůže tyto vetřelce před tím, než se stačí v děloze usadit a stabilizovat.

Imunitní buňky nejsou vyčerpány- takže mohou útočit na všechny vetřelce pronikající do dělohy do doby, než se zavře krček

Oslabení funkce neutrofilů okolo porodu

1. Ztráta L-selectin – neutrofilynemohou provádět kolébavé přichycení podél nejmenších žilek
2. Snížená schopnost zabít bakterie-
neschopnost aktivovat myeloperoxidázu
mající za následek nedostatečné respirační
vzplanutí.
3. Vyčerpání zásob neutrofilů → neutropenia
následovaná metritidou, akutní mastitidou.

Krávy se sníženou imunitou

Menší průnik neutrofilů jako odpověď na první pronikající bakterie.

A neutrofily, které se tam dostanou fungují na méně než 50%.

Imunitní systém je zahlcen těmito časnými vetřelci, kteří nyní rostou exponenciálně.

Jak roste počet bakterií stává se obtížnější je zničit protože vytvoří biofilmy a pronikají do endometria

Od této chvíle bude překonání infekce vyžadovat velkého úsilí.

Toll- like receptory rozpoznají bakteriální antigeny → IL-8 a další cytokiny.

- Stimul pro zvýšenou migraci neutrofilů do dělohy kterou my po několika dnech nazýváme metritis.

Může dojít k vyčerpání počtu imunitních buněk → neutropenia, lymfopenia. To zanechá krávu vnímavou k nové infekci ke každému novému vetřelci, který se dostane dovnitř před tím, než se krček uzavře.

Endometritis

Zánět endometria- výstelky dělohy.

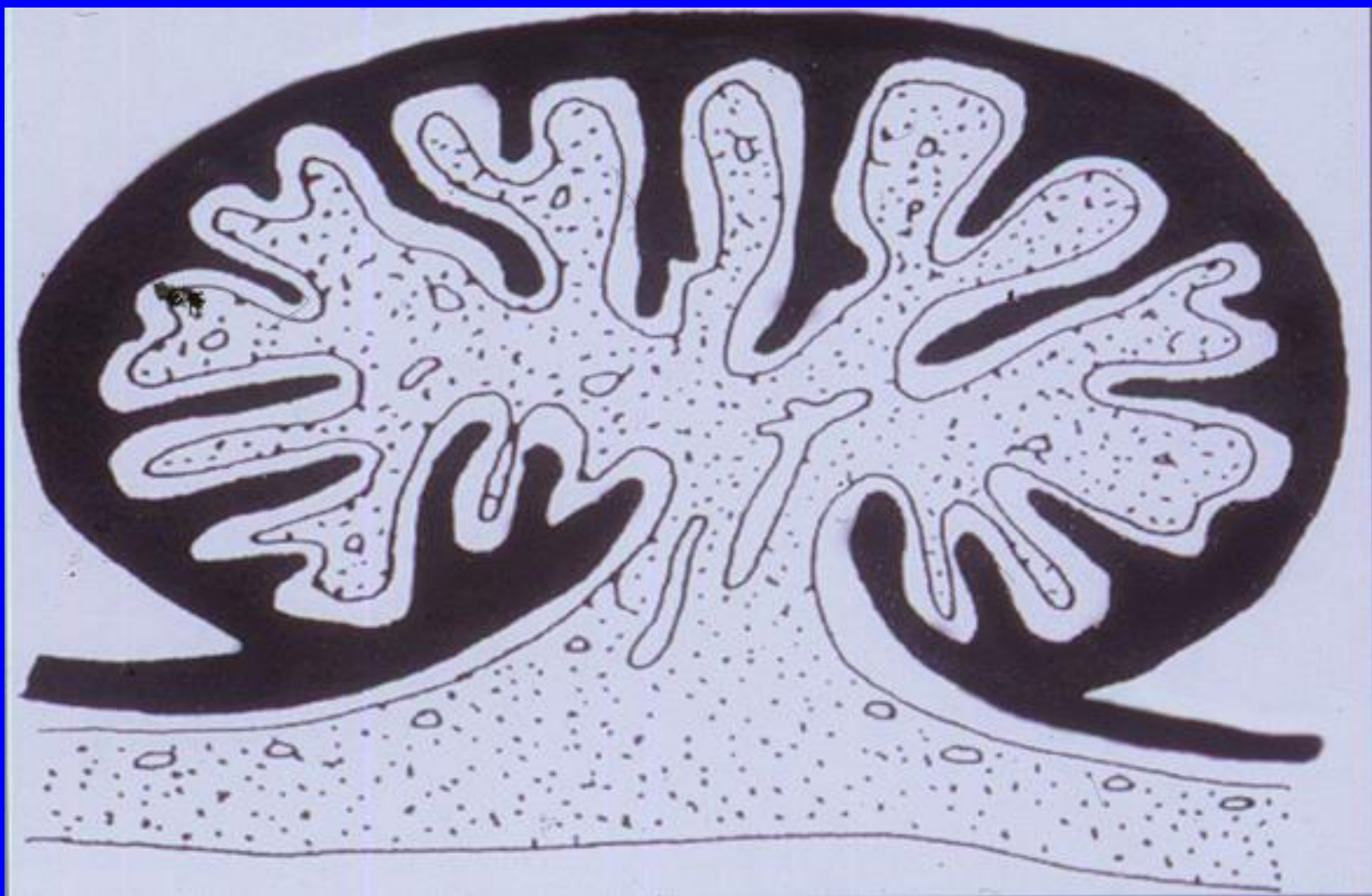
Lze ho nalézt u téměř každé krávy v 21 dnu laktace

Zdravé krávy mají mírnou endometritidu ve 35 dnech laktace. Krávy se sníženou imunitou v prvních týdnech jsou endometritidou více ohroženy.

Je tato kráva v
imunopresii ?

Gunnink, 1983, Vet Q J





Gunnink, J W Vet Q. 6:52, 1984

„tkáně plodu musí být rozpoznána jako cizí a odmítnuty aby došlo k oddělení tkání matky a plodu“

Cai et al. 1994

Snížená funkce neutrofilů před otelením u těch krav, které onemocní metritidou.

Imunitní teorie zadržného lůžka

1. Spojení mezi zadržným lůžkem a použitím glukokortikoidů pro vyvolání porodu:

-imunosuprese vyvolaná glukokortikoidy?

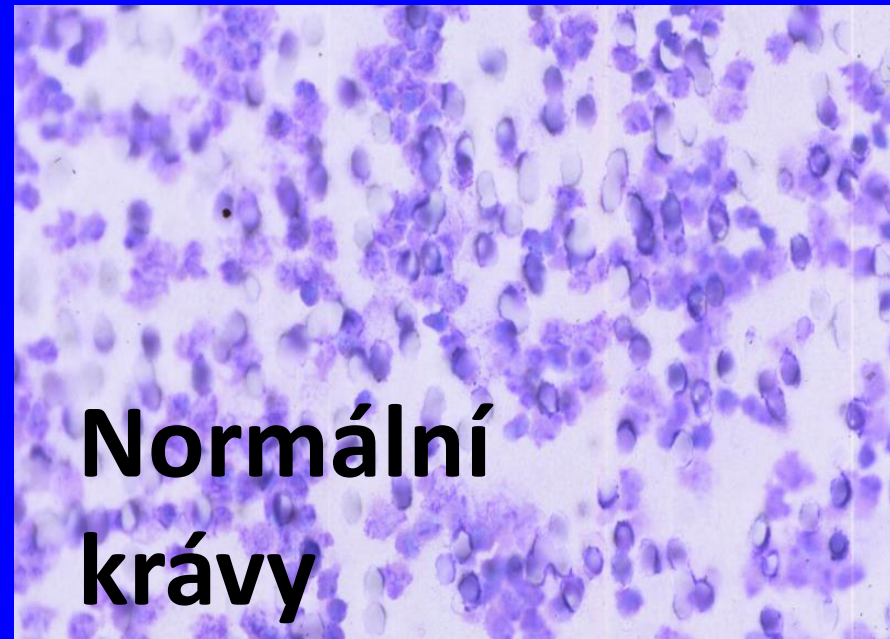
2. Deficit vitamínu E a Se zvyšuje výskyt zadržných lůžek a mastitidy.

- může to být z důvodu snížené funkce neutrofilů?

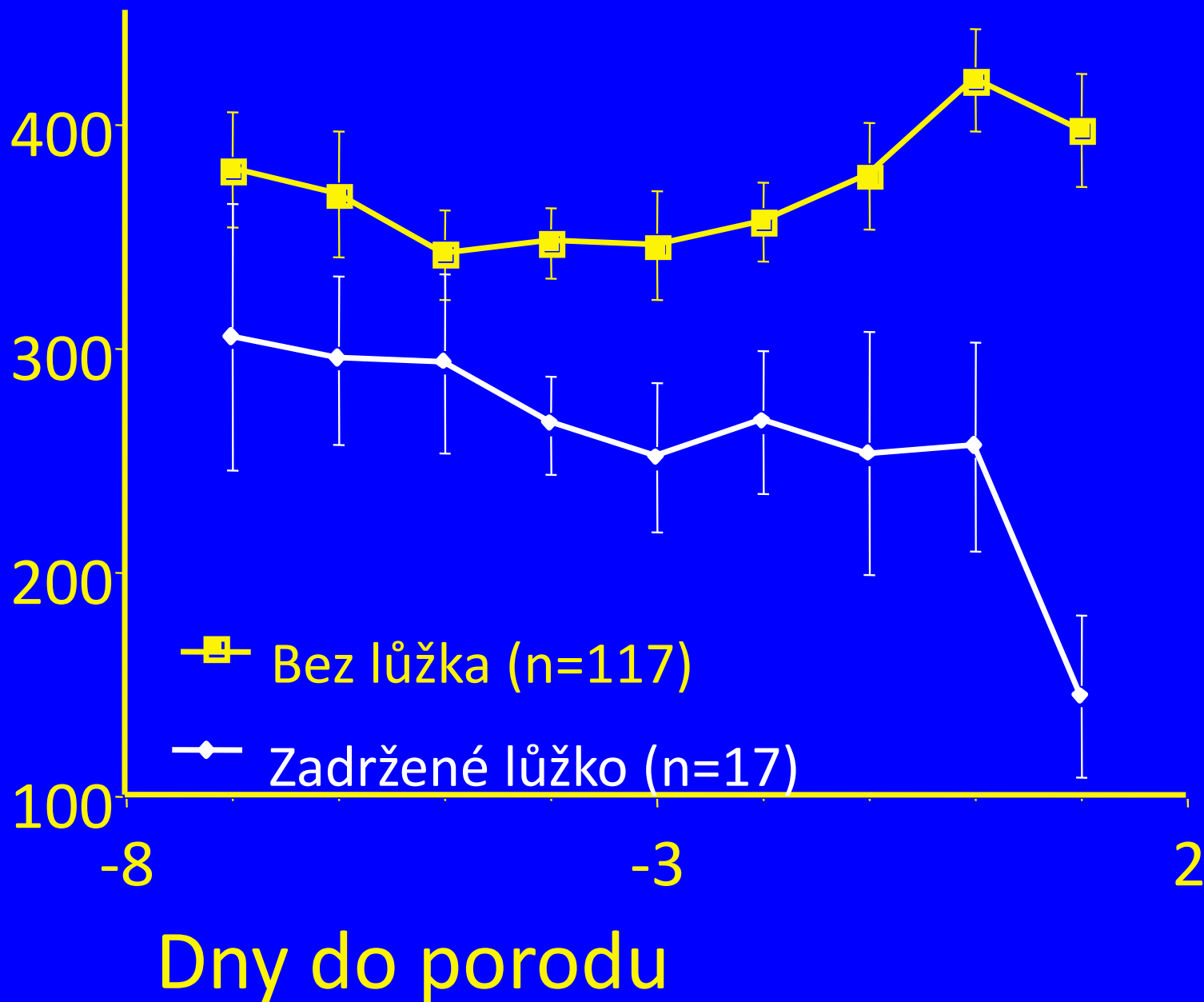
Zkouška v Boydenově komoře



Membrána s
mikroskopickými póry



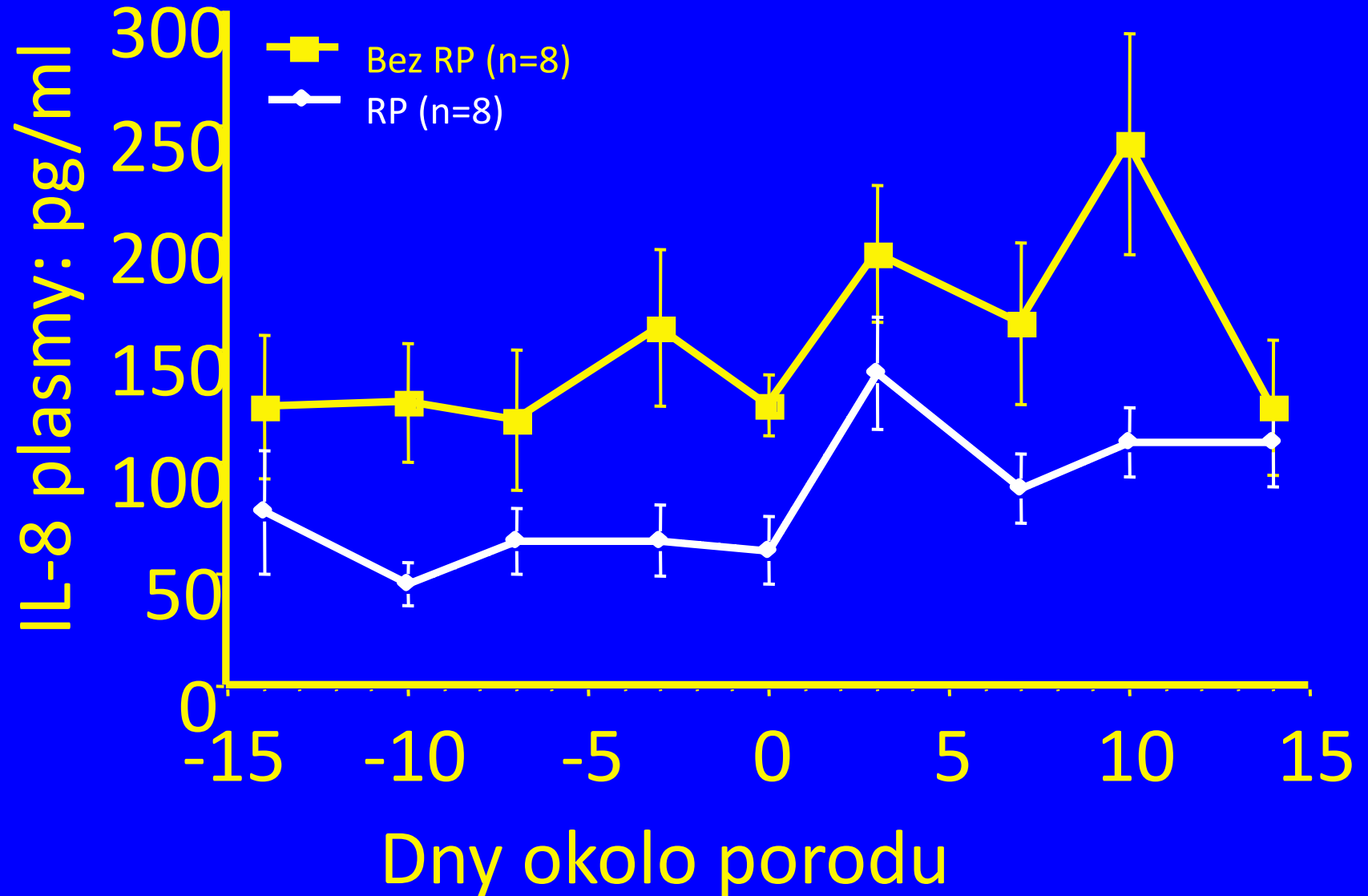
Chemotaktická aktivita



Ab proti IL-8 inhibují chemotaktickou aktivitu PMN
(PMN získány z 26 krav, průměr ± st.odchylka)

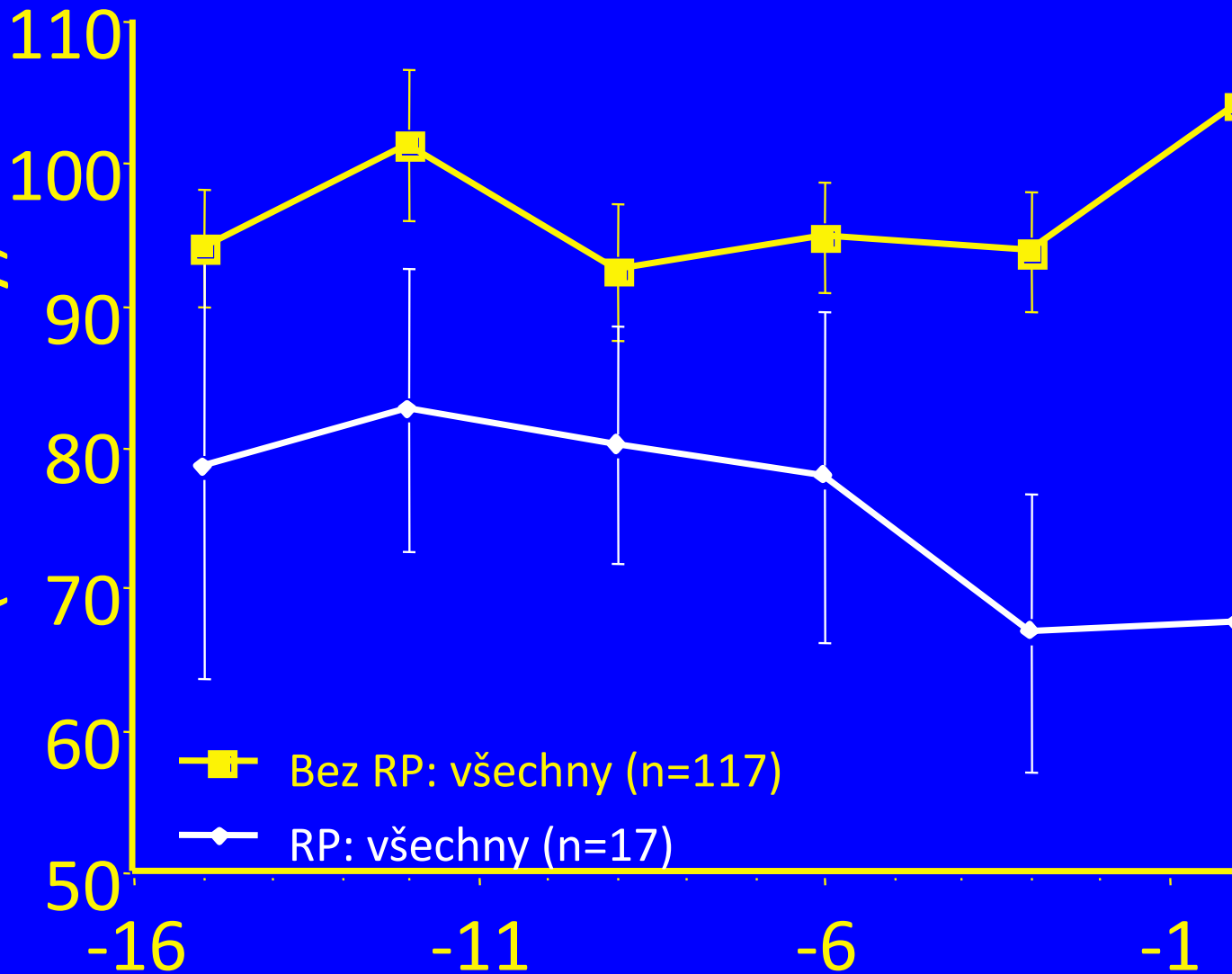
Chemoatraktant	Počet buněk (5 polí)
kotyledon	271 ± 18
kotyledon + mAb IL-8	159 ± 10 (58.7 %)

Hladina IL-8 v plasmě krav se
zadržným lůžkem je nižší.



Jodinační aktivita

(% kontroly)



■ Bez RP: všechny (n=117)

◆ RP: všechny (n=17)

Dny před porodem

Zhoršení imunity a zdraví dělohy

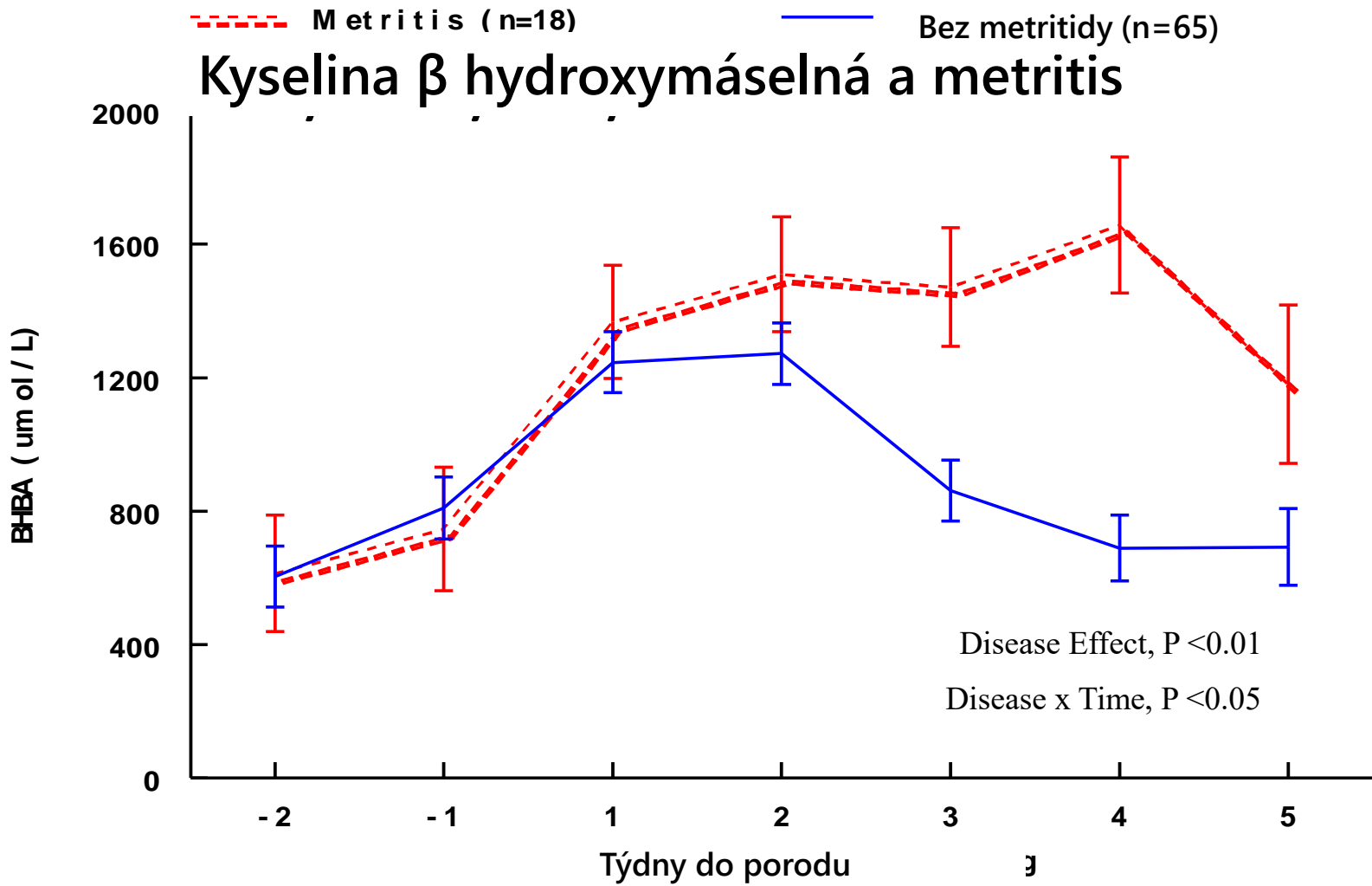
Kim et al., 2005. leukocyty krav s diagnostikovanou endometritidou (zakalený výtok a zvětšená děloha ve 4 týdnech po otelení) projevovaly špatnou fagocytární aktivitu v týdnech -1, 1, 2, 3, a 4 okolo porodu.

Urton et al., 2005. krávy které onemocněly metritidou (první 3 týdny laktace) žraly o 22 minut denně méně než krávy se zdravou dělohou.

-každých 10 minut o které žraly méně zdvojnásobilo šanci na metritidu!! (75 min nebo méně = práh)

Hammon et al., 2006

- Studoval 83 krav v období okolo porodu
- Vzorky krve odebírány týdně pro stanovení funkce neutrofilů
- Krávy vyšetřované na metritidu v prvních 10 dnech laktace- silný zápach, vodnatý, hnědý výtok s nebo bez horečky
- Endometritida diagnostikována ve 28 dnech po porodu na základě cytologie děložní laváže

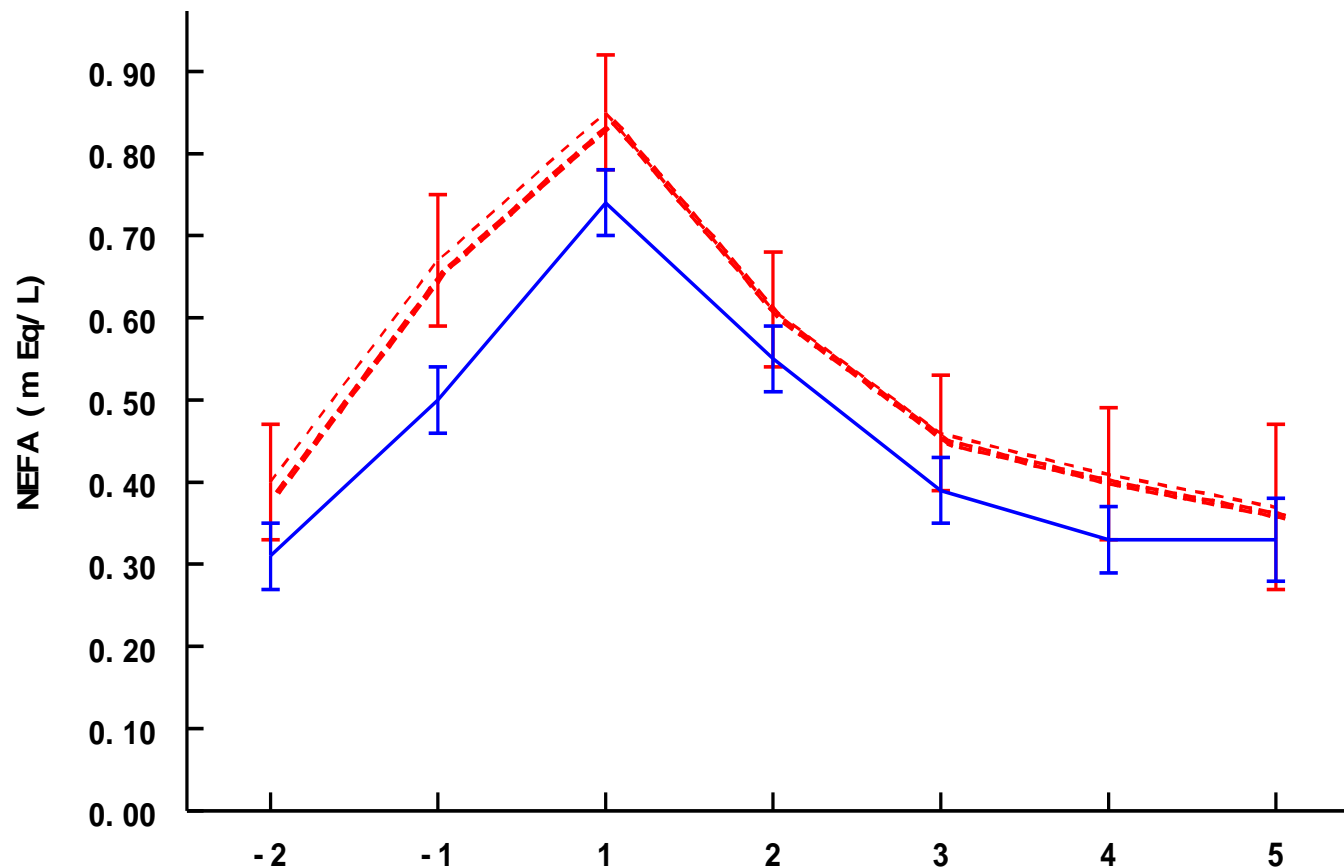


Metritis = páchnoucí výtok nebo hnisavý výtok ve 3 až 7 dni laktace s nebo bez teploty

--- Metritis (n=18)

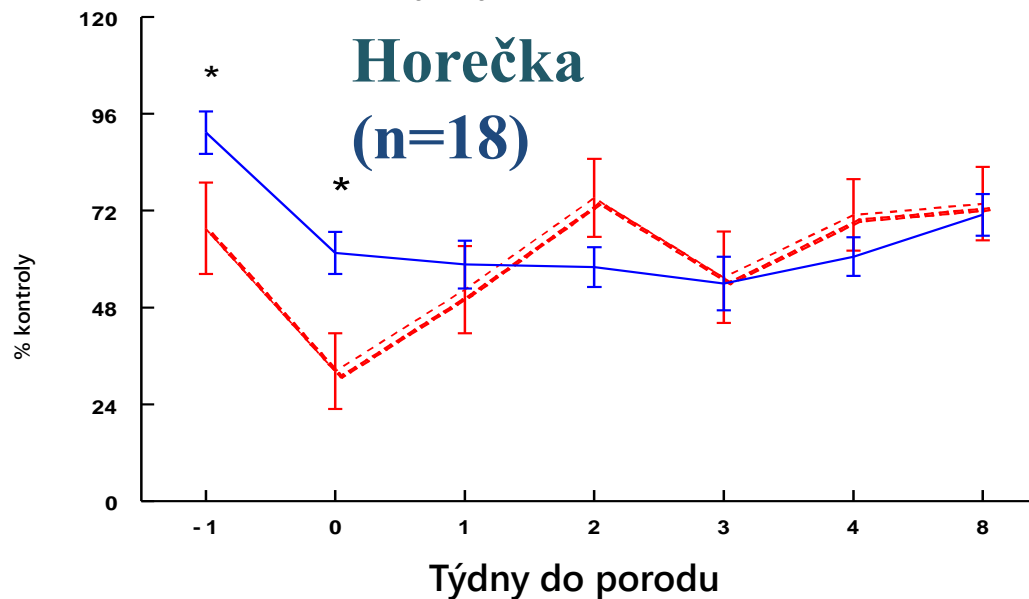
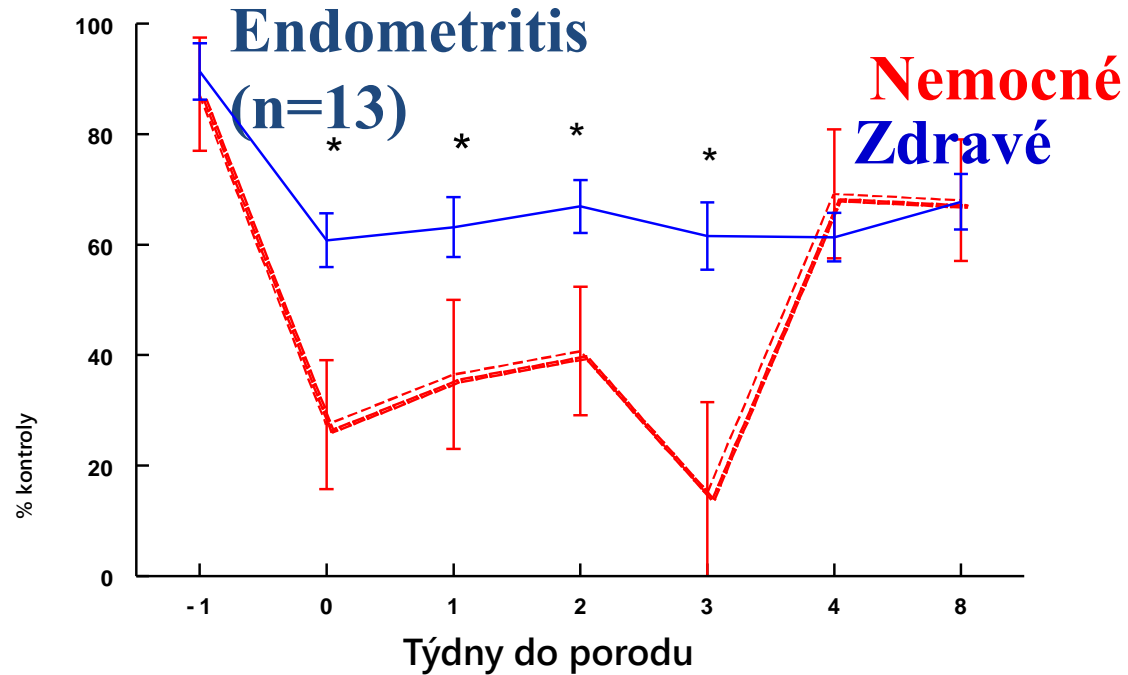
— Bez metritidy (n=65)

Neesterifikované mastné kyseliny a metritida

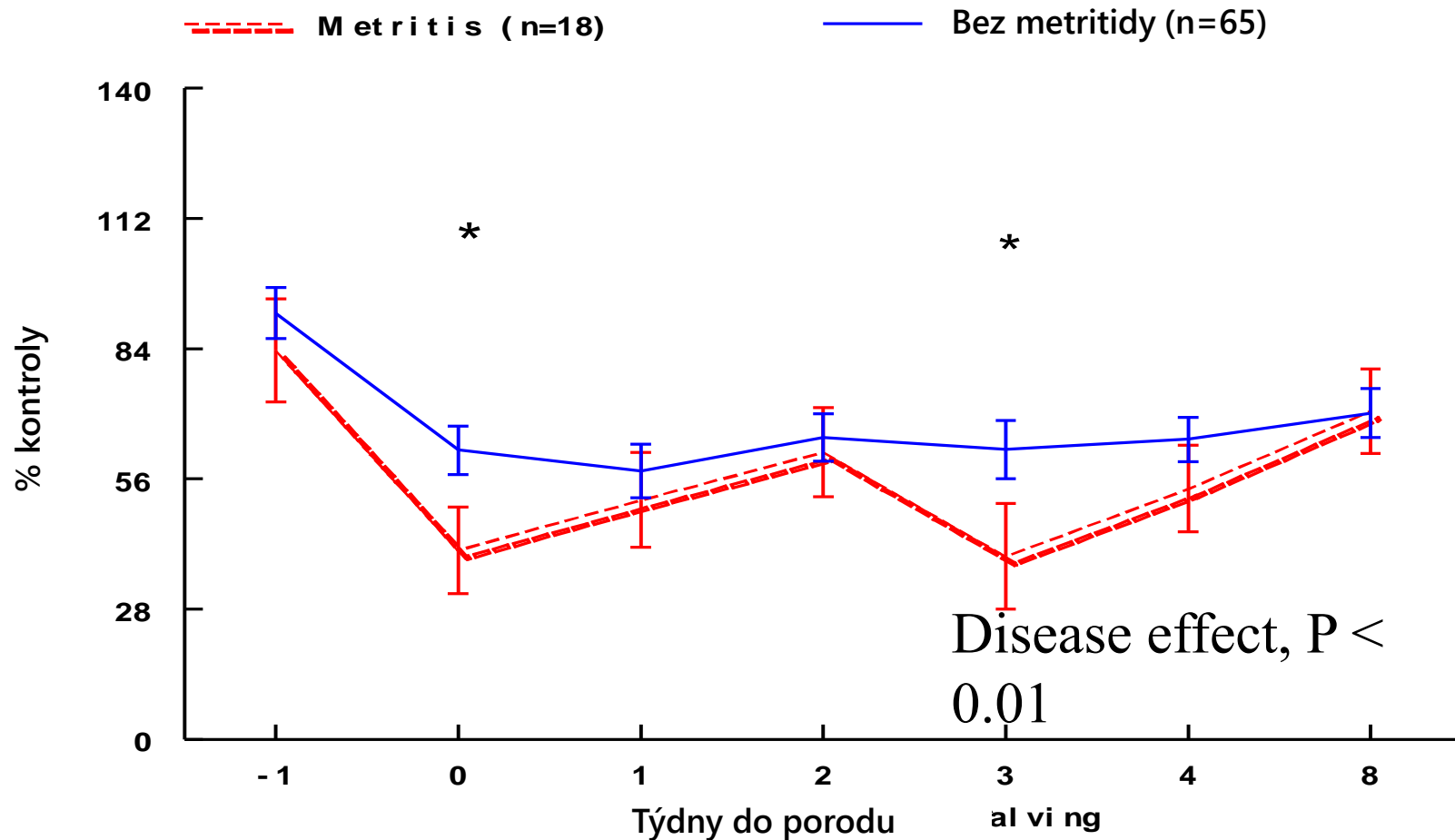


Metritis = páchnoucí výtok nebo hnisavý výtok ve 3 až 7 dni laktace s nebo bez teploty

Funkce neutrofilů a zdraví dělohy

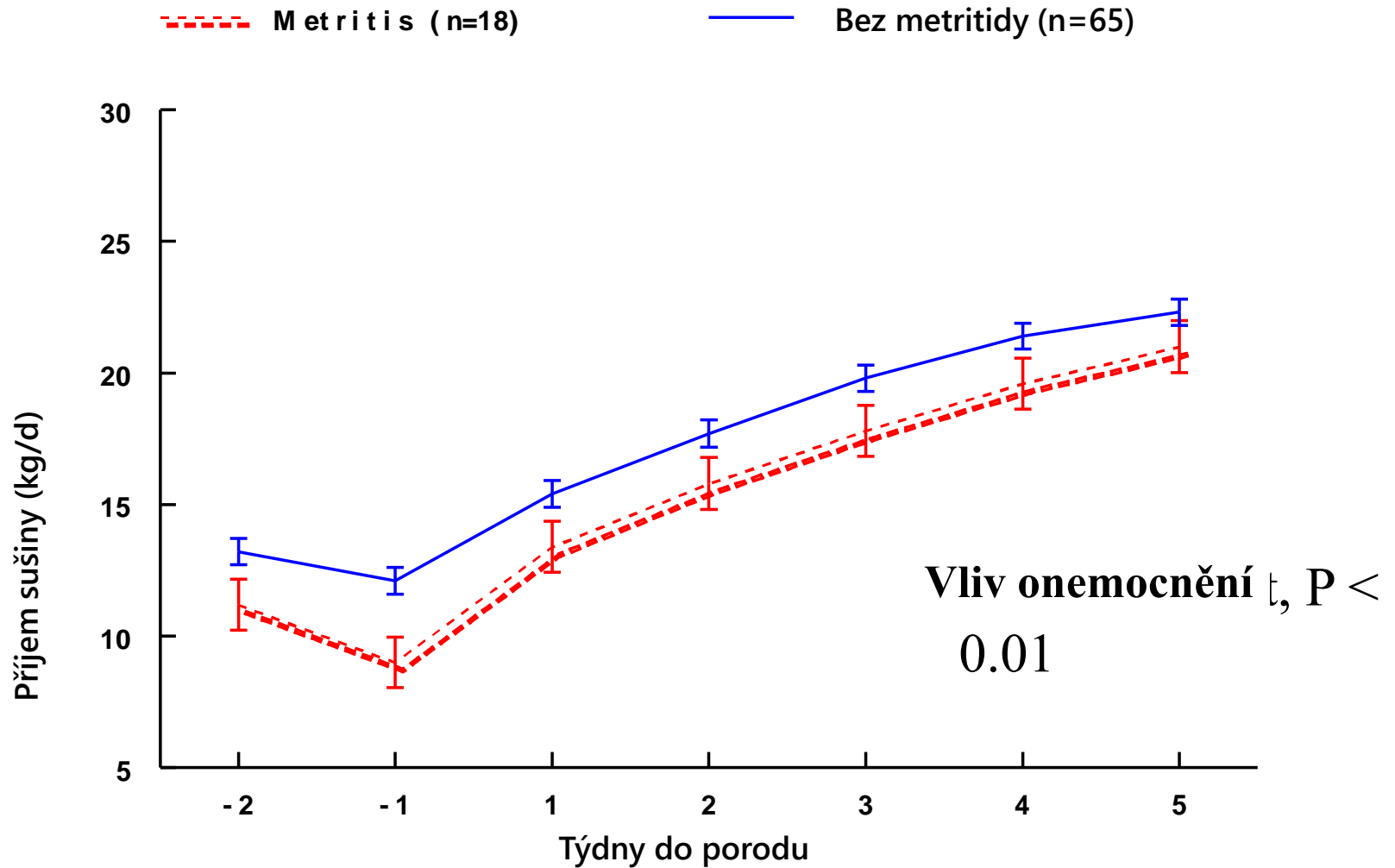


Funkce neutrofilů a metritis



Metritis = páchnoucí výtok nebo hnisavý výtok ve 3 až 7 dni laktace s nebo bez teploty

Příjem sušiny a metritis



Metritis = páchnoucí výtok nebo hnisavý výtok ve 3 až 7 dni laktace s nebo bez teploty

Poporodní paréza= vstupní nemoc
pro další choroby

Snížení funkce svalů

= více mastitid

= více přesunutých slezů

Snížení příjmu krmiva

= více ketos/ztučnělých jater

= více přesunutých slezů

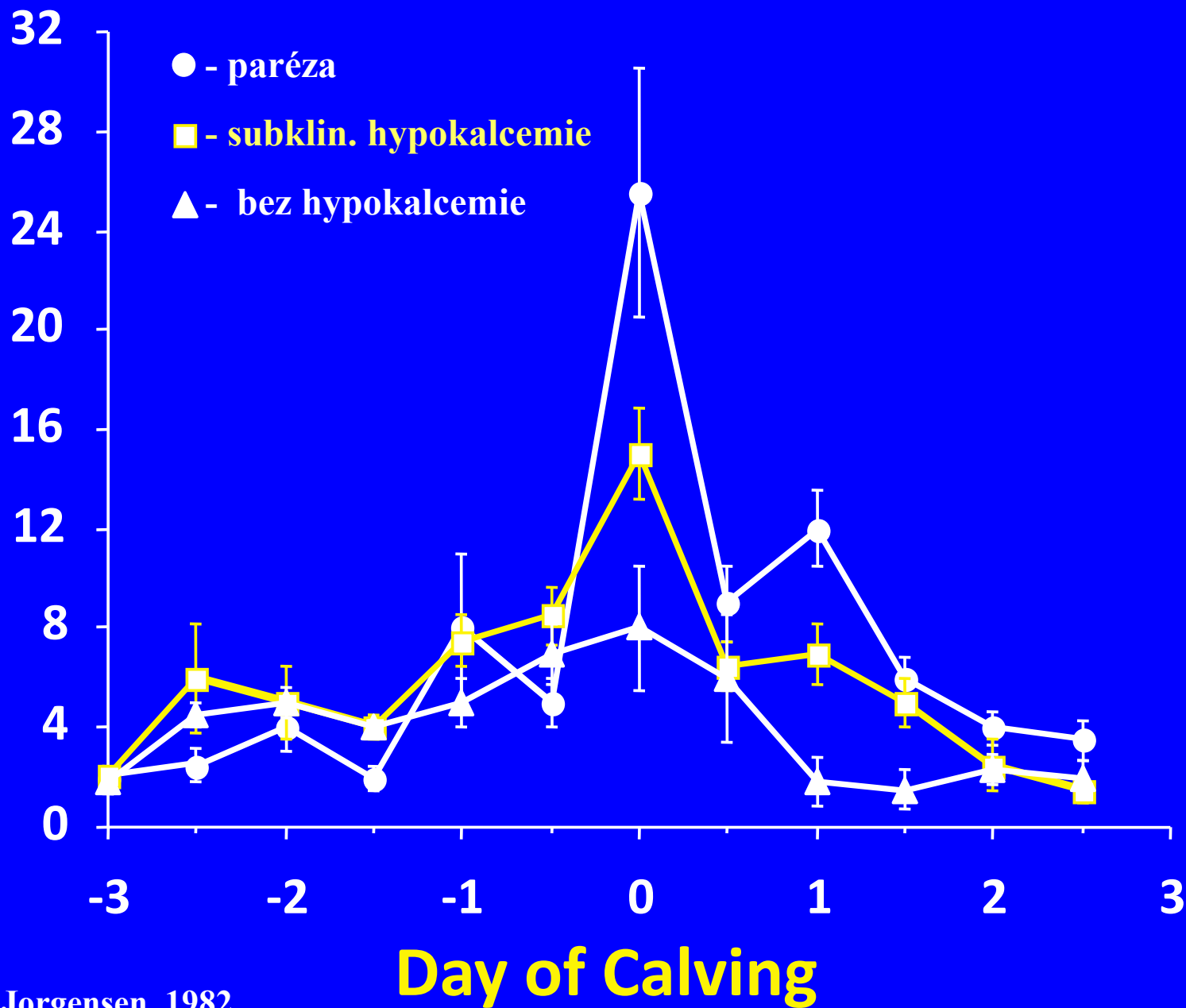
Snížení funkce imunity

= více mastitid

=více zadržovaných lůžek



**Kortisol v plasmě
(ng/ml)**



Horst and Jorgensen, 1982

Nález z klinického vyšetření 19 ulehých krav vs porovnání s 19 normálními kravami ze stejných stád (Whiteford and Sheldon, 2005)

	Normální	Paréza
# klinických endometritid	8	15
Průměr oteleného rohu	31	49
Průměr druhého rohu	25	39
# zvířat s CL	13	4

Hypokalcémie & riziko vzniku metritid

Martinez et al., 2012

Krávy rozděleny na ty které měly vysoké nebo nízké riziko vzniku metritid. Krávy s „vysokým rizikem“ měly komplikovaný porod, zadržené lůžko, dvojčata nebo mrtvě narozené tele.

Subklinická hypokalcémie (SCH) je definována $Ca < 2.15$ mmol/l během dne 0, 1, 2. krávy s SCH měly více metritid (40.7%) než krávy s normální hladinou vápníku (14.3%).

Krávy s nízkým rizikem

Krávy se subklinickou hypokalcemií mají více metritid (40.7%) než krávy s normální hladinou vápníku (14.3%).

Krávy s vysokým rizikem

Krávy s subklinickou hypokalcemií mají více metritid (77.8%) než krávy s normální hladinou vápníku(20.0%).

V porovnání se zdravými kravami měly krávy s SCH sníženou funkci neutrofilů (fagocytosu a respirační vzplanutí) a vyšší hladiny NEFA a BHBA v séru.

Dny do první ovulace byly stejné u obou skupin ale pregnancy rate a servis perioda byly výrazně zhoršené SCH.

Martinez et al., 2012

Riziko vzniku metritidy bylo nižší o 22% při každém zvýšení vápníku v krevním séru o 0,25 mmol/l.

Martinez et al., 2012

Endometritida a lipopolysacharidy (LPS) a anestrus

- LPS uvolněné během odúmrti bakterií E. Coli v děloze mohou vadit vlně LH nezbytné pro vyvolání další ovulace.

Pokud kráva neovuluje a má žluté tělísko může progesteron potlačit imunitní odpověď a umožnit, aby převládla *T. pyogenes*.

- Masné krávy, kterým byla dána infuze *T. pyogenes* do dělohy onemocněly *A. pyogenes* pouze tehdy, pokud měly žluté tělísko.
- Odstranění žlutého tělíška PGF-2 alpha může často pomoci uzdravení z endometritidy.

Časný zásah proti metritidě

McLaughlin et al, 2013

Může být riziko metritidy sníženo tím, že podáme „rizikovým“ kravám Ceftiofur během 24 hodin od otelení??

Rizikové krávy = krávy, které měly obtížný porod (vyžadující pomoc), dvojčata, zmetalky, zadržené lůžko 12 hodin nebo kombinaci uvedených faktorů.

Krávy ze 6 komerčních stád rozděleny na „rizikové“ krávy léčené a neléčené.

Výskyt metritid ve 14 dnech byl 28.7% proti 43.5% u krav léčených Ceftiofurem nebo fyziologickým roztokem s pravděpodobností 1.92 ($P < 0.05$).

rektální teploty první a druhý den a průměr prvních 6 dnů byl nižší u krav léčených Ceftiofurem ($P < 0.05$) v porovnání s kontrolní skupinou.

,