

Vědecký výbor výživy zvířat

**Gram-pozitivní původci mastitid dojeného skotu
a možnosti jejich eliminace pomocí olejů s obsahem
mastných kyselin o střední délce řetězce**

**prof. MVDr. Eva Skřivanová, Ph.D.
Ing. Klára Laloučková**

Praha, červen 2021



ISBN 978-80-7403-251-6

Obsah

1. Úvod.....	3
2. Teoretická část studie	4
2.1. Bovinní mastitida.....	4
2.1.1. Charakteristika onemocnění	4
2.1.2. Patogenní bakterie indukující boviní mastitidu.....	5
2.1.3. Ekonomické dopady výskytu mastitid v chovu skotu	12
2.1.4. Alternativní antibakteriální látky	13
3. Experimentální část studie.....	16
3.1. Materiál a metodika.....	16
3.1.1. Použité chemikálie	16
3.1.2. Bakteriální kultury a jejich uchování.....	17
3.1.3. Stanovení minimálních inhibičních koncentrací	18
3.2. Výsledky.....	21
3.3. Diskuze.....	23
4. Závěr.....	25
5. Reference.....	26

1. Úvod

Patogeny způsobující mastitidu v chovech mléčného skotu představují významné obecné ohrožení, jelikož se u nich lze setkat s rostoucím výskytem bakteriální antibiotické rezistence. Antibiotika jsou hlavní možností, jak výskyt mastitid snižovat, či eliminovat, především s ohledem na potenciál přenosu mastitidy na další zvířata a kontaminaci životního prostředí patogenními bakteriemi, zejména prostřednictvím procesu dojení. Toto onemocnění s sebou navíc přináší ekonomické ztráty a další náklady, které negativně ovlivňují odvětví mlékárenského průmyslu. S ohledem na tyto skutečnosti jsou alternativní přístupy využívání přírodních antimikrobik při léčbě nebo kontrole mastitidy v chovu mléčného skotu velmi důležité. Je známo, že potenciál antibakteriálního účinku mastných kyselin se střední délkou uhlíkového řetězce (MCFA) je u celé řady patogenů nezanedbatelný, ale existují pouze omezené informace o aktivitě MCFA na patogeny způsobující mastitidu. Kromě toho neexistují v soudobé literatuře důkazy o antimikrobiálních účincích palmových olejů bohatých na MCFA, jako je kokosový, palmojádrový, či tucuma olej vůči zmiňovaným bakteriím. Cílem této studie proto bylo vyhodnotit *in vitro* antibakteriální aktivitu palmových olejů bohatých na MCFA po štěpení exogenní lipázou z *Mucor javanicus*, vůči grampozitivním bakteriálním druhům, které způsobují mastitidu skotu (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* a *Streptococcus uberis*) mikrodiluční bujónovou metodou. Všechny testované palmové oleje vykazovaly antibakteriální aktivitu vůči osmi testovaným bakteriálním kmenům v rozmezí minimálních inhibičních koncentrací 64–8192 $\mu\text{l/ml}$, přičemž *Str. agalactiae* se prokázal jako nejcitlivější a *S. aureus* jako nejodolnější druh. Výsledky této studie naznačují, že palmové oleje bohaté na MCFA mohou sloužit jako alternativa, či doplněk k běžně používaným „predip“ a „postdip“ postupům při kontrole mastitidy v chovech skotu s doporučením provedení dalších *in vivo* studií, které by potvrdily zjištění této práce v rámci možné praktické aplikace.

2. Teoretická část studie

2.1. Bovinní mastitida

2.1.1. Charakteristika onemocnění

Bovinní mastitida je definována jako zánět mléčné žlázy způsobený u dojnic patogenními mikroorganismy, které osidlují a rozkládají tkáň produkující mléko (Tremblay et al. 2014). Toto onemocnění představuje celosvětově významný problém pro producenty mléka kvůli obtížím spojeným s obvyklou léčbou tohoto onemocnění (McInerney et al. 1992). Četnost výskytu mastitidy je obvykle vyšší při pozdějších laktacích ve srovnání s dojnicemi při první laktaci (Kasna et al. 2018). Mastitida se může projevit dvěma různými způsoby – subklinicky (bez viditelných příznaků) a klinicky (s různými příznaky, včetně mírných, jako jsou vločky v mléce, mírný otok infikované čtvrti; nebo závažných – např. abnormální sekrecí mléka, horečkou, rychlým pulsem, ztrátou chuti k jídlu, depresí a úmrtím) (Schroeder 2012). Klasickým přístupem k léčbě mastitidy u skotu je používání antibiotik, avšak tato léčba je spojena s různými nevýhodami, mezi které patří především nízká míra vyléčení, zvyšující se výskyt bakteriální rezistence vůči antibiotikům a přítomnost jejich reziduí v mléce (Gomes a Henriques 2016). Obvyklou praxí v léčbě nebo kontrole mastitidy u stád dojnic je pak především intramamární antibiotická terapie, přičemž komerční intramamární antimikrobiální produkty dostupné v Evropě obsahují buď jednotlivá antibiotika (benzatin-cefalexin, cefalotin, benzatin-cefapirin, cefazolin, benzatin-kloxacin, či rifaximin), nebo směs dvou nebo tří antibiotik. Produkty kombinující více antibiotik obsahují např. kombinace benzatin-oxacilinu se sodnou solí oxacilinu, framycetin sulfátu s erythromycin steátem, neomycin sulfát se spiramycinem, prokain penicilin G se sodnou solí novobiocinu, benzatin-kloxacin s neomycin sulfátem, či prokain penicilin G s neomycin sulfátem (Gruet et al. 2001; Bhosale et al. 2014). U aktuálně dostupných terapií pro kmeny *S. aureus* způsobující mastitidu však dosahuje míra úspěšnosti léčby necelých 50 % (Ster et al. 2013). Antibiotická terapie bovine mastitidy souvisí také s rostoucí antimikrobiální rezistencí u různých bakteriálních kmenů, včetně izolátů z infikovaných krav, jiných zvířat ze stejného stáda, a dokonce i z potravinářských produktů, které pocházejí z infikovaných/uzdravených zvířat (Silva et al. 2018). Mezi moderní přístupy k léčbě a prevenci mastitidy proto patří nesteroidní protizánětlivé léky (Breen 2017) a intramamární těsnění struků (Kromker et al. 2014), jež se snaží snižovat negativní dopad antibiotik v rámci živočišné produkce.

2.1.2. Patogenní bakterie indukující bovinní mastitidu

Existuje více než 250 mikroorganismů, které mohou být u skotu příčinou mastitidy (Bhuvana a Shome 2013) sestávající ze dvou různých skupin bakterií podle původu mikrobiálního znečištění: nakažlivé patogeny, které žijí na povrchu vemene a kůži struků a přenášejí se z postiženého zvířete na zvíře během dojení (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis*); a patogeny životního prostředí, které jsou přítomny např. v podestýlce, a které se mohou přenášet během dojení nebo mezi dojeními, při krmení, či během odpočinku (*Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*) (Dufour et al. 2019). V návaznosti na obsah praktické části této studie bude další text věnován bakteriálnímu druhu *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus* spp.

2.1.2.1.1. *Staphylococcus aureus*

Charakteristika

Staphylococcus aureus, z řeckého *staphylé* – hrozen, *kokkos* – bobule a latinského *aureus* – zlatý, je druh nepohyblivých, nesporulujících grampozitivních bakterií náležících k rodu *Staphylococcus*. Bakterie průměrné velikosti 0,5–1 μm se vyskytují samostatně, v párech, či tvoří shluky ve vypouklých, hladkých, lesklých, průsvitných koloniích s ucelenými okraji, jejichž pigmentace se pohybuje v odstínech šedé, žluté až oranžové (Schleifer a Bell 2009). *S. aureus* byl poprvé identifikován v hnisavé tekutině z abscesu nohy Ogstonem v 80. letech 19. století a krátce nato formálně izolován Rosenbachem (Newsom 2008), který rozlišil lidské stafylokokové izoláty na základě pigmentace jejich kolonie, navrhuje nomenklaturu *S. aureus* a *S. albus* pro žluté, respektive bílé kolonie (Rosenbach 1884). Posledně jmenovaný druh je nyní označován jako *S. epidermidis* (Thomer et al. 2016). Stafyloxantin, karotenoid vázaný na membránu, produkovaný *S. aureus*, je zodpovědný za žlutou pigmentaci kolonií. Produkci pigmentu jsou zachycovány reaktivní formy kyslíku, čímž je *S. aureus* chráněn před eliminací fagocyty (Clauditz et al. 2006). Schopnost srážet lidskou a živočišnou krev nebo plazmu je charakteristickým znakem *S. aureus* a je zprostředkován dvěma secernovanými produkty, koagulázami (Coa) a von Willebrand-faktor vázajícím proteinem; *S. epidermidis* je Coa negativní, *S. aureus* Coa pozitivní (Cheng et al. 2010). Mezi Coa pozitivní stafylokokové druhy jsou dále řazeny např. *S. delphini*, *S. intermedius*, či *S. pseudintermedius*, druh, který se přizpůsobil různým hostitelům (norek, liška, holub a pes), ale nekolonizuje lidskou populaci (Guardabassi et al. 2012).

S. aureus je také invazivním patogenem a častou příčinou onemocnění kůže a měkkých tkání, krevního řečiště a také původcem otrav z jídla (Schleifer a Bell 2009). Jakmile patogen vstoupí

do krve, replikuje se a šíří na mnoho různých míst těla, což ústí v závažné projevy onemocnění, jako je sepse, infekční endokarditida a hluboké abscesy prakticky v každé možné orgánové soustavě (David a Daum 2010). Komplikací infekcí *S. aureus* je tzv. syndrom toxického šoku indukovaný produkcí enterotoxinů (A, B, C – 3 typy, D a E), kdy patogen na vstup do organismu odpovídá produkcí enterotoxin-podobných proteinů (Silversides et al. 2010).

Patogenita

S. aureus má rozsáhlý repertoár virulenních faktorů, který mu umožňuje přežít extrémní podmínky v hostiteli. K infekcím dochází často v důsledku přímého vniku *S. aureus* do otevřené rány, či predispozičním poškozením sliznice v důsledku virové infekce, kdy se předpokládá, že počáteční expozice bakterií *S. aureus* vůči hostitelským (především mukózním) tkáním či kůži vyvolává upregulaci virulenních genů (Novick 2003). Na tvorbu bakteriálních produktů, či poškození tkáně reagují fagocyty a buněčný epitel hostitele aktivací imunitního systému, kdy jsou peptidoglykan a lipoproteiny *S. aureus* rozpoznány pattern recognition receptory (Hashimoto et al. 2006). Produkty rozkladu hyaluronanu (Scheibner et al. 2006) a endogenní ligandy „toll-like“ receptorů (RNA, DNA, HMGB1) uvolňované nekrotickými tkáněmi (Cavassani et al. 2008) během infekce dále zvyšují prozánětlivou signalizaci organismu vedoucí k aktivaci lokálních imunitních buněk a množení neutrofilů a makrofágů (Liu 2009). Po dosažení místa infekce uvolní neutrofilové řadu antimikrobiálních látek, včetně antimikrobiálních peptidů, reaktivních forem kyslíku (ROS), reaktivních forem dusíku (RNS), proteáz a lysozymu. Obrana proti ROS je u bakterií *S. aureus* zprostředkována aktivací velkého počtu antioxidantních enzymů (např. katalázy, pigmenty, superoxid dismutáza), které neutralizují ROS a RNS (Foster 2005). Antimikrobiální peptidy, které cílí na negativně nabitě bakterie, nejsou vůči *S. aureus* účinné, neboť tento mění své povrchové napětí (Collins et al. 2002). Navíc jsou antimikrobiální peptidy degradovány aureolysinem (Sieprawska-Lupa et al. 2004) a neutralizovány stafylokinázou (Jin et al. 2004). Bakteriální invaze a přežití v hostiteli nezávisí pouze na úspěšném vzdorování imunitnímu systému, ale také na úspěšném získávání živin, zejména železa (Maresso a Schneewind 2006). Během bakteriální infekce je 95 % železa deponováno bezpečně v hostitelských buňkách a sérové železo je většinou vázáno na hostitelské proteiny, které nejsou snadno přístupné. Pokud dochází u *S. aureus* k nedostatku železa, bakterie vylučují vysoce afinitní sloučeniny vázající železo (aureochelin a stafyloferrin) (Drechsel et al. 1993). Navíc, pokud *S. aureus* detekuje nízký obsah železa, iniciuje transkripční program pro získávání železa, který umožňuje zachycování hemu a haptoglobinu na buněčném

povrchu, transport komplexu železa přes plazmatickou membránu a následnou oxidační degradaci hemu v cytoplazmě (Maresso a Schneewind 2006).

Dalším fenoménem spojovaným s bakteriemi *S. aureus* je fakt, že produkují v reakci na různé stresové podněty tzv. perzistery, kteří představují určitou část bakteriální populace, jež vykazuje toleranci k antibiotikům (Kubistova et al. 2018). Podle zjištění Peyrussona et al. (2020), *S. aureus* v přítomnosti vysoké koncentrace různých antibiotik, vykazuje dvoufázový způsob usmrcování, což znamená, že většina bakteriální populace je citlivá a rychle usmrcena, zatímco subpopulace s pomalejší rychlostí usmrcování přetrvává mnohem delší časové období. Perzistentní populace navíc vykazuje reverzibilitu fenotypu po odstranění antibiotika.

Epidemiologická situace

Navzdory vysoké prevalenci literatury charakterizující stafylokokovou patogenezi u lidí je *S. aureus* hlavní příčinou infekce a onemocnění u mnoha zvířecích hostitelů, což vede k významnému dopadu na veřejné zdraví, a také zemědělství. Infekce u zvířat škodí zdraví zvířat a ta tak mohou působit jako rezervoár přenosu stafylokoků na člověka. Události přechodu hostitele mezi lidmi a zvířaty, či mezi zvířaty navzájem jsou časté, a byly znásobeny domestikací a komercializací konkrétních druhů zvířat (Haag et al. 2019). *S. aureus* je hlavní příčinou bakterémie a infekční endokarditidy, jakož i infekcí souvisejících s osteoartikulárními, kožními a měkkými tkáněmi, pleuropulmonárními chorobami, infekcemi močového traktu a je spojen také se syndromem toxického šoku, meningitidou, či septickou tromboflebitidou (Tong et al. 2015). Díky své vysoké rezistenci a široké škále onemocnění, jež je schopen vyvolat, je hlavní infekcí, kterou lze získat přenosem v nemocničních zařízeních (Bonten et al. 2001), avšak velice významný je i tzv. s hospodářskými zvířaty asociovaný *S. aureus*, který může způsobovat závažná onemocnění v chovech potravinových zvířat, mezi které lze řadit také i mastitidu skotu (Fitzgerald 2012).

Možnosti léčby a prevence

Prakticky všechny kmeny bakterií *S. aureus* byly na počátku 40. let dvacátého století, kdy byl penicilin G oficiálně představen, citlivé vůči tomuto antibiotiku, avšak již v roce 1944 se objevily první zprávy o penicilin-rezistentním *S. aureus* a dnes jsou prakticky všechny kmeny rezistentní na přírodní peniciliny, aminopeniciliny, antipseudomonální peniciliny (Neu 1992) a vlivem zkřížené rezistence také na oxacilin (Cormican a Jones 1996). Nejprve byly případy penicilin-rezistentního *S. aureus* omezené a objevovaly se pouze ve zdravotnických zařízeních, avšak v průběhu času bylo detekováno šíření rezistentních druhů v celé řadě prostředí (Chambers 2001). Posléze byl k léčbě infekcí způsobených na penicilin rezistentním *S. aureus*

vyvinut meticilin a další peniciliny rezistentní na penicilinázy, které se setkaly s počátečním úspěchem, nicméně v průběhu času se začaly objevovat a šířit kmeny MRSA – nejprve v nemocničním prostředí a posléze v rámci běžné populace (Rice 2006). Běžnou praxí v léčbě infekcí způsobených na β -laktamázy-pozitivními MRSA izoláty je kombinace β -laktamového antibiotika (amoxicilin) spolu s β -laktamázovým inhibítor (kyselina klavulanová) (Jamil et al. 2017). Obecně je MRSA rezistentní k širšímu spektru antibiotik (tzv. multirezistence) díky tomu, že exprese genu *mecA* kódujícího nízkoafinitní penicilin vázající protein (PBP2a) uděluje *S. aureus* kromě meticilinu rezistenci i k jiným β -laktamům (Utsui a Yokota 1985). Zároveň tato rezistence zahrnuje typicky i jiné třídy antibiotik (Aucken et al. 2002), a infekce způsobené MRSA je tak těžké léčit vzhledem k tomu, že multirezistence zahrnuje dále aminoglykosidy, makrolidy, linkosamidy, tetracykliny, cefalosporiny, karbapenemy, kombinace zahrnující β -laktamázové inhibitory, trimethoprim, sulfonamidy a chinolony (Baquero 1997). V nedávné době byla identifikována u lidských i zvířecích MRSA izolátů nová varianta *mecA* známá jako *mecC* (*mecC*-MRSA), kódující PBP2c, který však nezprostředkovává přímo rezistenci na penicilin (García-Álvarez et al. 2011). Širokospektrá rezistence β -laktamů u kmenů *mecC*-MRSA je spíše zprostředkována kombinací PBP2c a odlišné β -laktamázy kódované *bla*_{ZLGA251}, která je součástí *mecC* kódujícího SCC*mec* typu XI. (Ba et al. 2015). Vzhledem k výskytu multirezistentních kmenů *S. aureus* je v klinické praxi k léčbě infekcí MRSA běžně používán vankomycin (Tabuchi et al. 2017). Avšak i u tohoto antibiotika byl nedávno hlášen výskyt rezistentních kmenů, tzv. vankomycin-intermediate-rezistentních *S. aureus* (VISA), které vykazují slabou toleranci vůči vankomycinu (MIC 4–8 $\mu\text{g/ml}$) (Howden et al. 2010) a vankomycin-rezistentních kmenů *S. aureus* (VRSA), které jsou vysoce rezistentní vůči vankomycinu, díky přítomnosti exogenních genů, jakým je např. *vanA* (Melo-Cristino et al. 2013). Vzhledem k prevalenci infekcí způsobených bakteriemi *S. aureus*, může být empirická terapie peniciliny nebo cefalosporiny nedostatečná (Elliott et al. 2009). Lee et al. (2011) proto doporučují kombinovanou terapii penicilinu rezistentního na penicilinázu nebo cefalosporinu (v případě, že bakterií je meticilin-senzitivní *S. aureus*) v kombinaci s klindamycinem nebo chinolonem. Jiní navrhují použití klindamycinu, TMP/SMX, rifampinu, doxycyklinu nebo chinolonu spíše v kombinaci než samostatně, a tak se v regionech s relativně nízkým výskytem rezistence na klindamycin tento může stát preferovanou ambulantní antibiotickou terapií (ve srovnání s TMP/SMX) (Williams et al. 2011).

Omezení šíření bakteriálních infekcí způsobených *S. aureus* je spojeno především s prevencí vzniku biofilmů, které jsou tímto bakteriálním patogenem tvořeny na mnoha různých površích (Bhattacharya et al. 2015).

2.1.2.1.2. *Streptococcus* spp.

Charakteristika

Název bakterií rodu *Streptococcus*, vycházející z latinského spojení slov *streptus* a *coccus*, je označuje jako poddajné hrozny, což vystihuje jejich morfologické znaky, mezi které náleží sférický nebo vejčitý tvar, velikost menší než 2 μm v průměru, a výskyt v řetězcích nebo v párech. Grampozitivní, fakultativně anaerobní buňky streptokoků jsou dále charakteristické nepohyblivostí, neschopností tvořit spóry, chemoorganotrofií s fermentativním metabolismem produkujícím laktázu bez tvorby plynů, a negativním katalázovým testem (Whiley a Hardie 2009).

Tradičně se streptokoky subklasifikují dle vzhledu na krevním agaru, který určuje jejich rozdělení na základě stupně hemolýzy do tří skupin na alfa-hemolytické, indukující na krevním agaru pouze částečnou hemolýzu; beta-hemolytické s plnou hemolytickou aktivitou (s výjimkou *Str. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, který není beta-hemolytický, ale je do této skupiny zařazen z taxonomických důvodů); a ne-hemolytické (Abranches et al. 2019). Facklam (2002) dělí streptokoky pouze na beta-hemolytické a ne-hemolytické, jelikož tvrdí, že složení média včetně typu krve a inkubační atmosféry může ovlivnit, zda dojde k tzv. „alfa“ hemolýze, a že neexistuje žádný zdokumentovaný enzym nebo toxin, který by ovlivňoval červené krvinky a umožňoval streptokokům alfa-, tedy částečnou hemolýzu.

Pomocí sérologického systému, vyvinutého Rebecou Lancefieldovou v roce 1933, jsou druhy beta-hemolytických streptokoků dále klasifikovány podle typu hlavního povrchového polysacharidového antigenu (Lancefield 1933). Druhy beta-hemolytických streptokoků nejčastěji spojovaných s humánními a veterinárními chorobami jsou řazeny do Lancefieldových skupin A, B, C, a G. Antigen skupiny A a skupiny B je charakteristický pro konkrétní druhy, zatímco antigeny skupin C a G se vyskytují na malém počtu blízkých příbuzných druhů (často souhrnně nazývané jako tzv. skupina C/G) (Facklam 2002). Konkrétně zahrnuje skupina A např. *Str. pyogenes*, nejvíce patogenní druh streptokoků, způsobující život ohrožující invazivní infekce, jako je nekrotizující fasciitida a syndrom toxického šoku, který je spojen s vysokou morbiditou a mortalitou (Ibrahim et al. 2016); skupinu B představuje *Str. agalactiae*, patogen, který je častou příčinou morbidity a mortality ve vysoce rizikových populacích

(těhotné ženy, novorozenci a starší osoby) a podílí se na vzniku bovinních mastitid (Raabe a Shane 2019); skupina C zahrnuje především zvířecí patogeny, jako je *Str. dysgalactiae* subs. *dysgalactiae*, který mimo jiné také vyvolává zánět vemene (Rato et al. 2011); skupina G poté zahrnuje lidské i zvířecí druhy streptokoků, jako je *Str. canis*, který způsobuje např. infekce močových cest a kůže, či syndrom toxického šoku (Lam et al. 2007).

Streptokoky však také mohou být děleny pomocí sekvenačních metod na základě podobnosti jejich 16S rRNA do šesti skupin, jmenovitě pyogenní, mitis, salivarius, bovis, mutans a hyovaginalis. Skupina streptokoků pyogenních (*Str. pyogenes* a *Str. agalactiae*) a mitis (*Str. pneumoniae*) zahrnuje jak komenzální, tak významně patogenní druhy způsobující závažné infekce u lidí i u zvířat. Skupina salivarius slučuje streptokoky, jejichž společným znakem je mimo jiné přítomnost významného množství kyseliny eikosanové (např. *Str. salivarius*, *Str. thermophilus*). Skupina bovis představuje soubor streptokoků lidského a zvířecího původu, jejichž klasifikace byla dlouho problematická (např. *Str. bovis* nebo *Str. pasteurianus*). Do skupiny mutans jsou řazeny streptokoky spojené se zubním plakem u člověka a několika druhů zvířat (např. *Str. mutans*, *Str. sobrinus*). Skupina hyovaginalis, jak již název napovídá, slučuje streptokoky vyskytující se v genitáliích, ale také dýchacích cestách domácích zvířat a ptáků (př. *Str. hyovaginalis*, *Str. thoralensis* a *Str. pluranimalium*) (Whiley a Hardie 2009).

Patogenita

Mnoho druhů invazivních streptokokových infekcí je v celosvětovém měřítku považováno za hrozbu pro veřejné zdraví (O'Brien et al. 2009). Bylo taktéž prokázáno, že např. *Str. agalactiae* může být spolu s jinými streptokoky zoonotickým patogenem (Barkema et al. 2009). Nejlépe jsou prozkoumány mechanismy patogenity beta-hemolytické skupiny A, zahrnující *Str. pyogenes*, a poznatky o chování tohoto druhu jsou aplikovatelné obecně i na ostatní streptokoky (Facklam 2002). V první fázi infekce streptokoky obvykle kolonizují slizniční orgány, jako je nosohltan a obecně dýchací, gastrointestinální a urogenitální trakt (Hasty et al. 1992). Po tomto úvodním kolonizačním kroku se bakterie šíří do dalších orgánů (Akuzawa a Kurabayashi 2016). Na nově osídlených místech se streptokoky mohou setkat s odlišnými podmínkami daného prostředí hostitele, zahrnujícími oxidaci, teplotu, pH anebo nedostatek živin, které mohou v bakteriích vyvolat stresové reakce (Trainor et al. 1999). Druhy *Streptococcus* spp. proto mají vyvinutou řadu mechanismů, jak je překonat a přežít v daném prostředí (Froehlich et al. 2009; Hua et al. 2014). Bylo také prokázáno, že streptokokové

dvousložkové systémy jsou hlavní cestou regulace genů souvisejících se stresem u těchto bakterií (Downey et al. 2014).

Epidemiologická situace

Jediným druhem streptokoků, který je vzhledem ke své antibiotické rezistenci zapojený v monitorovacím systému států EU a USA, je *Str. pneumoniae* (EFSA a ECDC 2019; CDC 2019). Tzv. pneumokok je oportunistický patogen, který kolonizuje slizniční povrchy horních cest dýchacích člověka a Weiser et al. (2018) uvádí, že až 27–65 % dětí a <10 % dospělých jsou přenašeči při komenzálním vztahu mezi bakterií a hostitelem (Abdullahi et al. 2012). Pneumokoky mohou způsobovat infekce celé řady tkání včetně plicního parenchymu a mozkových blan, jsou hlavní příčinou komunitní pneumonie a důležitou příčinou bakterémie, zejména u kojenců a starších osob (Parks et al. 2015). Penicilin-necitlivé *Str. pneumoniae* jsou zařazeny mezi patogeny se střední prioritou (stupeň 3 ze 3; nejnižší), pro než je nezbytný nový vývoj a objevy antibiotik (WHO 2017).

Možnosti léčby a prevence

Vzhledem k druhové rozmanitosti streptokoků a množství onemocnění, které mohou způsobovat je výčet možných terapií veliký, avšak penicilin zůstává lékem první volby pro beta-hemolytické streptokoky skupiny A, včetně senzitivních kmenů *Str. pyogenes* (Camara et al. 2013). Peniciliny dodnes slouží také jako profylaxe recidivy streptokoky vyvolané spály (Gerber et al. 2009). Včasná léčba infekcí penicilinem brání imunitní odpovědi vůči streptokokovým antigenům a současně předchází následkům streptokokální revmatické horečky a glomerulonefritidy (Cunningham 2000). Problémy s neúspěchem antibiotické léčby infekcí způsobených streptokoky mohou souviset s nesnadnou eradikací bakteriálních biofilmů (Baldassarri et al. 2006). Jako příklad diverzity možností antibiotické léčby infekcí způsobených invazivními streptokoky pak lze uvést, že Cunningham (2000) navrhuje k léčbě streptokokového zánětu nosohltanu cefalosporiny, erythromycin a amoxicilin-klavulanát, ale lékem první volby zůstává penicilin.

Alves-Barroco et al. (2020) doporučují jako alternativní léčbu streptokokálních infekcí použití bakteriocinů, bakteriofágů a nanočástic stříbra či mědi, a zároveň konstatují, že účinnost těchto látek není srovnatelná s účinností terapie antibiotiky, avšak doporučují kombinaci konvenčních a alternativních antibakteriálních látek pro zajištění maximálního účinku s možným přispěním k omezení šíření bakteriální rezistence. Ve standardech správné hygienické praxe ve zdravotnictví pro omezení šíření *Str. pyogenes* se lze setkat s obecnými doporučeními pro omezení bakteriálního šíření, které zahrnují časté mytí rukou, nošení ochranných prostředků a

izolaci infikovaného pacienta (Ostrowsky a Rosenthal 2018), což lze aplikovat jak v humánní, tak veterinární sféře na všechna onemocnění způsobená streptokoky, včetně bovinních mastitid.

2.1.3. Ekonomické dopady výskytu mastitid v chovu skotu

Bovinní mastitida je celosvětově považována za jednu z ekonomicky nejzávažnějších chorob, se kterou se lze v mlékárenském průmyslu setkat (Skuce et al. 2016; Getaneh et al. 2017), jelikož je u mléčného skotu stále vážným problémem, a tedy i důvodem k hledání alternativních možností léčby, zejména s ohledem na rostoucí bakteriální rezistenci vůči antibiotikům, která může pronikat i do jiných oblastí, nejen mléčného průmyslu. Samotný ekonomický dopad této nemoci je velice výrazný. Roční ztráty se v USA odhadují na přibližně 2 miliardy dolarů (Hossain et al. 2017). Aby bylo možné stanovit vhodné ekonomické pobídky k její prevenci a léčbě, je třeba získat přesné informace o skutečných nákladech, které jsou indukovány přítomností mastitidy v chovu. Tyto informace mohou pomoci posoudit životaschopnost a oprávněnost preventivních opatření týkajících se každé dojnice, konkrétního stáda, i celého odvětví mlékárenského průmyslu (Gussmann et al. 2019).

Náklady spojené s klinicky se projevenými mastitidami lze rozdělit do tří kategorií: (i) náklady spojené s léčbou, (ii) náklady spojené se zvýšenou úmrtností prostřednictvím utracení (tj. nahrazení vyřazených zvířat), a (iii) nepřímé náklady způsobené ztrátami produkce (Halasa et al. 2007). Mezi hlavní opatření související se snížením finanční ztráty/zátěže, kterou výskyt mastitidy v chovu dojeného skotu představuje, patří především cílená antibiotická léčba (Swinkels et al. 2005). S ohledem na obavy spotřebitelů související s používáním antibiotik v chovech potravinových zvířat a její přímou souvislostí s antimikrobiální rezistencí (Ruegg 2003) je však žádoucí hledat alternativní intervenční strategie. Takovou variantou může být například utracení krav s klinickou mastitidou, které přináší ekonomické výhody snížením přenosu patogenů způsobujících toto onemocnění, čehož lze dosáhnout také například zlepšením hygieny nebo biologické bezpečnosti chovu (Halasa et al. 2009). Snížení přenosu patogenů způsobujících mastitidu může proto vést k dlouhodobému nepřímému snížení nákladů v důsledku sníženého výskytu počtu nových případů (Steeneveld et al. 2011). Náklady spojené s výskytem mastitidy v chovu lze také rozdělit do dvou dalších kategorií: přímé a nepřímé (Kossaibati a Esslemont 1997). Přímé náklady zahrnují veterinární služby, diagnostiku, ošetření, další požadavky na pracovní sílu, a v průběhu léčby vyřazené mléko. Nepřímé náklady jsou poté definovány jako náklady, které nejsou výrobcí mléka vždy zřejmé, a proto jsou označovány také jako skryté náklady. Nepřímé ztráty způsobené (sub)klinickou mastitidou totiž

nejsou snadno kvantifikovatelné, avšak zahrnují sníženou produkci mléka, předčasné ztráty při vyřazení krav a snížené ohodnocení mléka dle jakosti (Azooz et al. 2020).

Gussmann et al. (2019) konstatuje, že snížení úrovně přenosu patogenů způsobujících mastitidu prostředky jako je např. zvýšená hygiena a biologická bezpečnostní opatření, jsou jediným možným způsobem, jak současně snížit počet případů mastitid v chovu dojnic, incidenci antibiotické léčby a míru utracení související s mastitidami. Proto lze konstatovat, že využívání alternativních antibakteriálních látek, které by byly schopny snížit zátěž, kterou představují patogenní bakteriální původci bovinních mastitid, může představovat nejen přístup omezující prohlubování bakteriální antibiotické rezistence, ale také ekonomickou výhodu při produkci mléka.

2.1.4. Alternativní antibakteriální látky

V současné době hrají přírodní látky stále velmi významnou roli v procesu objevování a vývoje nových léčiv (Newman a Cragg 2020), protože přírodní produkty jsou bohatým zdrojem sloučenin s antibakteriální aktivitou (Saleem et al. 2010). Významné procento nových antibiotik jsou buď samotné přírodní produkty, nebo jsou z nich odvozeny (Gohel et al. 2006). V mnoha případech lze přírodní alternativy v podobě jedinečných bioaktivních sloučenin nalézt v mikroorganismech, rostlinách a živočišných druzích, kterým se daří v extrémním prostředí, jako jsou deštné pralesy, pouště a horké prameny (Dai et al. 2020). Stávající antibiotická bakteriální rezistence a obavy z nemožnosti zastavit její šíření, vzhledem k rostoucímu počtu multirezistentních organismů, směřují současný výzkum a vývoj třemi hlavními proudy: hledání nových antibiotik, vývoj nových antibiotických pomocných látek a screening alternativ k antibiotikům (Liu et al. 2019) jak v humánní medicíně (Rello et al. 2019), tak v živočišné produkci (Van Boeckel et al. 2015).

V živočišné produkci se na území EU se zákazem užívání antibiotických stimulantů růstu (EU 2003) vývoj a výzkum na poli antibakteriálních substancí zaměřuje především na hledání nových neantibiotických látek se stimulačním účinkem na produkci zvířat (Roselli et al. 2005), a na omezení možného rizika kontaminace živočišných produktů při zastavení subterapeutického podávání antibiotik, jak bylo v předchozích dekáдах zvykem (Skřivanová et al. 2011). Mezi takovéto látky se řadí: fyto-genní doplňkové látky, např. skořice (Toghyani et al. 2011), tymián (Jarriyawattanachaikul et al. 2016), či černucha setá (Ghasemi et al. 2014); rostlinné silice např. z oregana (Peng et al. 2016) nebo máty peprné (Emami et al. 2012); probiotika a prebiotika (Marinho et al. 2007); synbiotika (Bomba et al. 2006); jílové minerály (Lemke et al. 2001); a organické kyseliny (Hansen et al. 2007). Užívání některých

neantibiotických stimulátorů růstu, používaných za účelem zvýšení produkce namísto antibiotik, je v současné době také omezováno. Příkladem mohou být veterinární přípravky pro potravinová zvířata s obsahem oxidu zinečnatého, u kterého je celková bilance přínosů a rizik negativní. Důvodem je skutečnost, že hodnota antidiarrhoálního účinku oxidu zinečnatého nepřekračuje hodnotu jeho akumulární rychlosti v životním prostředí a riziko jeho potenciálního příspěvku ke zvýšení bakteriální rezistence (EMEA 2017).

2.1.4.1.1. Rostlinné oleje s obsahem mastných kyselin o střední délce řetězce

Rostlinné oleje obsahují různé biologicky aktivní složky, jako jsou karotenoidy, tokoferoly (Chiu et al. 2009), koenzym Q10 (de Souza Guedes et al. 2017), vitamíny, kyselina lipová, deriváty polyfenolů a jiné (Gulaboski et al. 2013). Jejich hlavní složku však představují mastné kyseliny (Anushree et al. 2017), což jsou karboxylové kyseliny s nerozvětvenými uhlíkovými řetězci, z nichž některé mohou obsahovat dvojně vazby (McGaw et al. 2002). Mastné kyseliny s dvojnými vazbami mezi některými z uhlíků jsou klasifikovány jako nenasycené a ty bez dvojných vazeb jako nasycené. Dále lze tyto sloučeniny dělit podle délky jejich uhlíkových řetězců na mastné kyseliny s krátkým řetězcem (<6 uhlíků; SCFA), mastné kyseliny se středním řetězcem (6 až 12 uhlíků; MCFA), mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (13 až 21 uhlíků; LCFA) a mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem (> 22 uhlíků; VLCA). Biologická aktivita mastných kyselin se liší v závislosti na stupni jejich nenasycení a délce (Desbois a Smith 2010).

Plody tropických palm, jakými jsou např. tucuma (*Astrocaryum vulgare*), kokosovník (*Cocos nucifera*) a palma olejná (*Elaeis guineensis*), jsou jedním z ekonomicky nejdůležitějších zdrojů rostlinných olejů, o nichž je známo, že obsahují hlavně MCFA, s převahou kyseliny laurové (C_{12:0}). Předpokládá se, že mastné kyseliny jsou odpovědné za antibakteriální aktivitu palmových olejů, protože se ale obvykle vyskytují ve formě triglyceridů, bylo prokázáno, že pro uplatnění jejich antibakteriálního účinku je nezbytné štěpení do podoby volných mastných kyselin, či monoglyceridů (Hovorková et al. 2018). MCFA vykazují inhibiční účinek vůči růstu řas (McGrattan et al. 1976), plísní (Era et al. 2015), prvoků (Faciola a Broderick 2014), a jak gramnegativních (Thormar et al. 2006), tak grampozitivních bakterií (Bergsson et al. 2001). Také inhibují produkci bakteriálních virulenčních faktorů jako jsou β-laktamázy, toxiny syndromu toxického šoku (Ruzin a Novick 2000) a hemolysiny (Liaw et al. 2004). Kromě kyseliny laurové obsahují oleje výše uvedených palm také určitý podíl kyseliny kapronové (C_{6:0}), kaprylové (C_{8:0}) a kaprinové (C_{10:0}), které také vykazují různé antimikrobiální vlastnosti (Hanczakowska et al. 2011; Huang et al. 2011; Kollanoor-Johny et al. 2012). Batovska et al. (2009) dochází k závěru, že jejich účinek vůči růstu bakterií je zesílen, když jsou MCFA

esterifikovány glycerolem a vytvářejí např. monolaurin. Ubogogu et al. (2006) pozorují *in vitro* inhibiční účinek oleje z palmových jader palmy olejné na *S. aureus*.

Přesný mechanismus účinku podílící se na antimikrobiálních vlastnostech mastných kyselin a monoglyceridů nebyl doposud objasněn. Ve skutečnosti mohou být různé bakterie a viry inaktivovány různými mechanismy, pro něž bylo identifikováno několik možných cílů (Desbois & Smith 2010). Yoon et al. (2015 & 2017) použil mikrobalační disipaci křemene (Quartz crystal microbalance-dissipation; QCM-D) a fluorescenční mikroskopii pro zkoumání působení kyselina laurové, laurylsulfátu, monolaurinu, kyseliny kaprinové a monokaprinu na destabilizaci lipidových dvojvrstev, které tvoří membránu bakteriálních buněk. Tyto studie prokázaly, že testované antimikrobiální látky měly odlišné účinky na lipidovou dvojvrstvu, přičemž kyselina laurová a kaprinová způsobily tvorbu tubulů, laurylsulfát a monokaprin úplnou solubilizaci dvojvrstvy, a monolaurin svým působením vytvořil sférické výčnělky z lipidové dvojvrstvy. Zmíněné výsledky naznačují, že ne všechny mastné kyseliny a jejich deriváty narušují bakteriální membrány stejným způsobem, i když jsou délky jejich uhlíkových řetězců stejné (Yoon et al. 2015; Yoon et al. 2017). V nižších koncentracích mohou mastné kyseliny a monoglyceridy inhibovat bakteriální růst tím, že brání dělení buněk interferencí s esenciálními buněčnými procesy v důsledku ztráty buněčného obsahu skrz membránu se zvýšenou permeabilitou. Ačkoli tímto není buňka usmrcena, ztráta materiálu její dělení zastaví za předpokladu interakce mastných kyselin či jejich monoglyceridů s intracelulárním cílem (Churchward et al. 2018). Předpokládá se, že membránové proteinové komplexy, vázané ve vnitřní membráně a zapojené do transportního řetězce elektronů, by mohly být inhibovány přítomností mastných kyselin, anebo monoglyceridů mimo buňku, přičemž jejich průnik vnější membránou, peptidoglykanovou vrstvou a periplazmatem nemusí být nutný. Mastné kyseliny a monoglyceridy mohou také interferovat s jinými buněčnými procesy vázanými na membránu, jakými je příjem živin nebo inhibice enzymů (Desbois & Smith 2010). Mechanismem účinku, který by vyžadoval vstup antibakteriální látky do buňky, je inhibice biosyntézy mastných kyselin uvnitř samotné bakteriální buňky (Sado-Kamdem et al. 2009). Inhibice biosyntézy mastných kyselin je již dlouho cílem ve vývoji léčiv, protože nabízí cíl, který stávající antimikrobiální látky nevyužívají, čímž existuje pouze malá šance na vznik zkřížené rezistence (Wang et al. 2020).

MCFA jsou v živočišné produkci používány jako zdroj energie podporující růst zvířat, pro kontrolu patogenů, podporu přirozené mikrobioty GIT, rozvoj imunity, a eradikaci patogenů v krmivu (Jackman et al. 2020). Nejčastěji jsou využívány především v chovech

monogastrických zvířat jako je drůbež (Khatibjoo et al. 2018) a prasata (Nguyen a Kim 2020), kde přispívají k optimalizaci produkce, avšak své uplatnění nalézají také v chovech přežvýkavců především jakožto regulátory metanogeneze (Yanza et al. 2020). Je však nutné konstatovat, že vliv MCFA na růst a užitkovost přímo souvisí s množstvím přídatku MCFA do diety zvířat; typem zařazovaných MCFA; charakteristikami základní diety; a také s fyziologickým stavem zvířat (Geng et al. 2016).

3. Experimentální část studie

3.1. Materiál a metodika

3.1.1. Použité chemikálie

Analyzovány byly tři oleje bohaté na MCFA: *tucuma* (*A. vulgare*), který byl zakoupen od společnosti Natural Sweet Botanicals (USA), kokosový (*C. nucifera*) a palmojádrový olej

(*E. guineensis*), které byly získány od společnosti Sigma-Aldrich (USA). Podle standardizované metodiky mikrodilučního testování antimikrobiální senzitivity bakterií, které rostou aerobně (CLSI 2013), byl každý olej analyzován ve třech jednotlivých experimentech, z nichž každý byl realizován ve trojím provedení. Před testováním byly oleje připraveny způsobem, který popsala Hovorková et al. (2018). Stručně řečeno, oleje byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu a emulgovány Tween 80 (oba Sigma-Aldrich), aby byla zajištěna dostatečná disperze do emulze o koncentraci 819 200 µg/ml. Konečná koncentrace rozpouštědel v testovaných vzorcích nepřesáhla 1 %; bakteriální životaschopnost tedy nemohla být ovlivněna (Wadhvani et al., 2009). Příslušné objemy emulzí byly zředěny v tryptonovém sójovém bujónu (TSB) (Oxoid, UK) nebo TSB obohaceném kvasinkovým extraktem (TSB-YE) (Oxoid), aby byla dosažena konečná koncentrace 8192 µg/ml. Emulze oleje v médiu byla poté doplněna lipázou z *Mucor javanicus* (Sigma-Aldrich) v množství 2,73 mg/ml (stanoveno dle lipolytické aktivity enzymu). Roztok byl poté třepán ve vodní lázni při 37 °C po dobu 1 hodiny, aby byly uvolněny MCFA z triglyceridů, a aby tedy bylo umožněno jejich antibakteriální působení. Ke kontrole růstu bakteriálních kultur byl použit penicilin G (Sigma-Aldrich).

3.1.2. Bakteriální kultury a jejich uchování

K určení antibakteriální aktivity testovaných hydrolyzovaných palmových olejů bohatých na MCFA bylo vybráno osm kmenů bakterií, u nichž bylo prokázáno, že vyvolávají mastitidu u dojníc. Kmeny použité pro testování, uvedené v Tabulce 1, byly zakoupeny z České sbírky mikroorganismů a z Německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur. Alikvoty bakteriálních kultur byly skladovány při -80 °C ve 20% glycerolu až do použití v TSB nebo TSB-YE. Zásobní kultury mikroorganismů byly před testováním kultivovány 24 hodin při teplotě 37 °C. Negativní a pozitivní kontrola bakteriálního růstu byla zahrnuta do návrhu experimentu v mikrotitračních destičkách (viz Obrázek 1).

Tabulka 1: Bakteriální kmeny použité pro testování antimikrobiální aktivity palmových olejů bohatých na středně dlouhé mastné kyseliny a jejich specifikace.

Bakterie	Kmen	Specifikace	Jiné označení
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Rosenbach 1884 ^{AL}	CCM 4442	izolát boviní mastitidy (ČR); produkce β-hemolysinu; atypický kmen: fosfatáza a vázaná koaguláza negativní	P. Benda M 27/92

	CCM 6188	izolát z mléčné žlázy skotu; ztráta produkce hemolysinů	B. Skalka K 126
	DSM 6732	izolát z vemene skotu; murein: A11.3; bez přítomnosti toxinových genů (PCR)	ATCC 25178
<i>Streptococcus agalactiae</i> Lehmann and Neumann 1896 ^{AL}	CCM 6187	izolát z mléčné žlázy skotu; (ČR); testovací organismus pro CAMP-test, produkční kmen pro CAMP-faktor; kontrolní kmen pro PYRAtest	J. Smola 3767
	DSM 6784	izolát infekce vemene skotu; Lancefield skupina B; beta-hemolytický; doporučován jako referenční kmen pro cAMP test	ATCC 27956
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i> (ex Diernhofer 1932) Garvie et al. 1983 emend. Vieira et al. 1998	DSM 20662	izolát skotu	ATCC 43078 NCDO 2023
<i>Streptococcus uberis</i> Diernhofer 1932 ^{AL}	CCM 4617	izolát subklinické mastitidy skotu (ČR); kontrolní kmen pro STREPTOtest a HIPPURATEtest	P. Benda 1268
	DSM 20569	typový kmen	ATCC 19436 CCUG 17930 JCM 5709 NCDO 2038 NCTC 3858


3.1.3. Stanovení minimálních inhibičních koncentrací

Minimální inhibiční koncentrace (MIK), udávající antibakteriální aktivitu hydrolyzovaného kokosového, palmojádrového a tucuma oleje vůči vybraným grampozitivním kmenům bakterií způsobujících bovinní mastitidu, byly stanoveny dle protokolu Institutu pro klinické a laboratorní standardy (CLSI 2013). *In vitro* mikrodiluční bujónová metoda byla provedena v 96ti jamkových mikrotitračních destičkách (viz Obrázek 1). Počáteční koncentrace štěpených palmových olejů pro testování jejich antibakteriální aktivity byla 8192 µg/ml.

Destičky byly naočkovány bakteriální suspenzí o konečné hustotě $5 \cdot 10^5$ KTJ/ml, čehož bylo dosaženo nefelometricky pomocí McFarland Densitometer Biosan DEN 1 (BioTech, Česká republika), a inkubovány při 37 °C po dobu 24 hodin. Růst bakterií před a po inkubaci byl měřen spektrofotometricky za použití Tecan Infinite® 200 PRO (Tecan Group Ltd., Švýcarsko) při vlnové délce 405 nm. Následná vizualizace bakteriálního růstu byla provedena přidáním 10 µl thiazolylové modři (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika) do každé jamky mikrotitrační destičky (viz Obrázek 2).

MIK byly vyjádřeny jako nejnižší koncentrace palmových olejů, které inhibovaly růst bakterií nejméně o 80 % ve srovnání s kontrolou růstu v bujónu bez oleje. Kromě toho byla také testována citlivost všech kmenů na penicilin G shodně pomocí stanovení MIK, jako v případě štěpených palmových olejů. Konečné hodnoty MIK testovaných sloučenin byly stanoveny jako modus všech měřených hodnot. Během experimentu byl antibakteriální účinek palmových olejů pozorován až po štěpení lipázou. Níže uvedené výsledky se proto vztahují pouze na oleje po štěpení lipázou z *M. javanicus*.

Obrazek 1: Design mikrotitrační destičky použitý pro testování minimálních inhibičních koncentrací palmových olejů bohatých na středně dlouhé mastné kyseliny pro bakteriální kmeny způsobující záněty vemene u skotu.

		kokosový olej			tucuma olej			palmojádrový olej					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
koncentrace palmového oleje [$\mu\text{g/ml}$] 	A		8192	8192	8192	8192	8192	8192	8192	8192	8192		
	B	kontrola čistoty	4096	4096	4096	4096	4096	4096	4096	4096	4096	kontrola růstu bakterie	kontrola čistoty
	C		2048	2048	2048	2048	2048	2048	2048	2048	2048		
	D		1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024		
	E		512	512	512	512	512	512	512	512	512		
	F		0256	0256	0256	0256	0256	0256	0256	0256	0256		
	G		128	128	128	128	128	128	128	128	128		
	H		56	56	56	56	56	56	56	56	56		

3.2. Výsledky

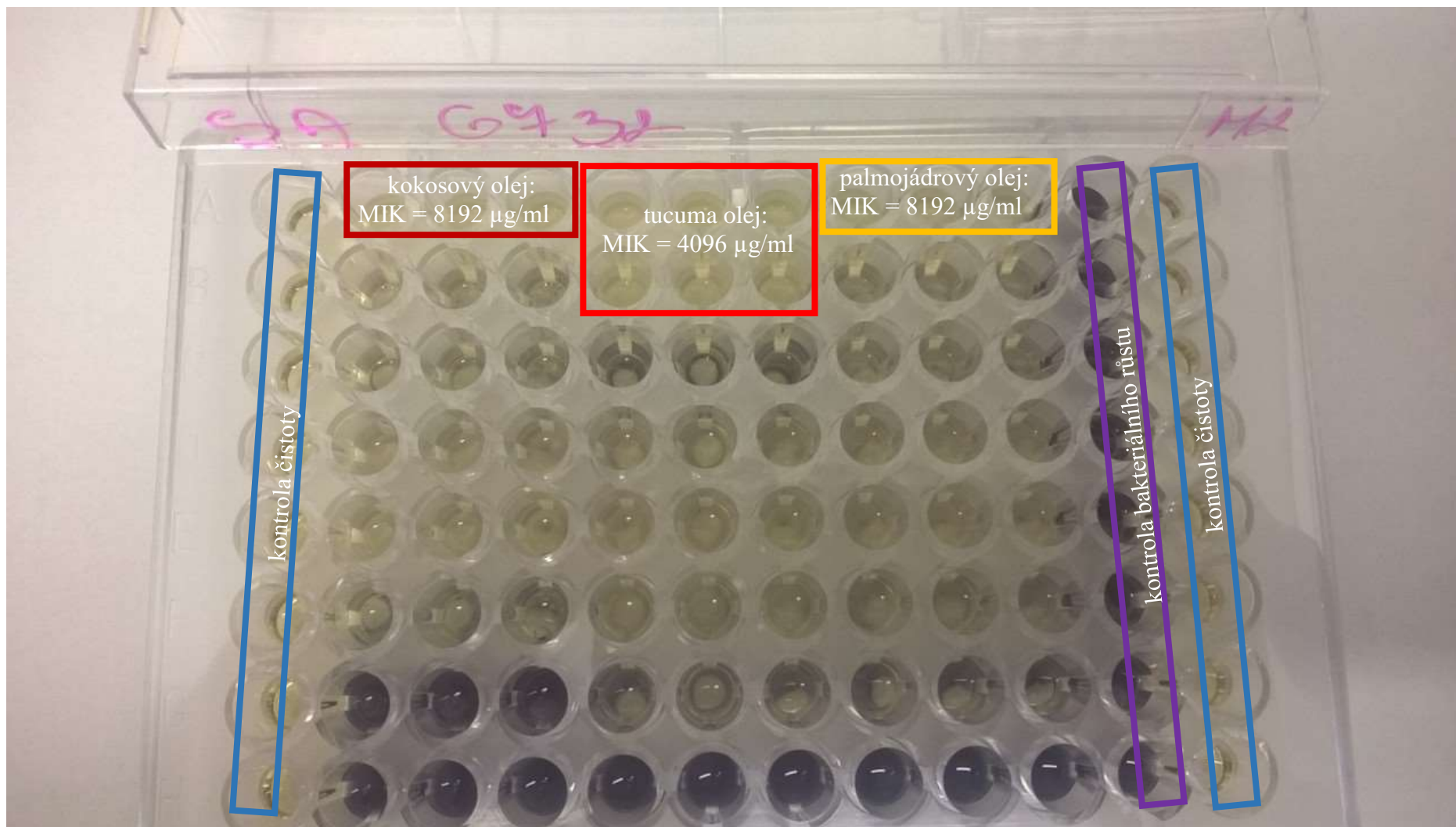
MIK zobrazené v Tabulce 2 ukazují citlivost všech testovaných grampozitivních patogenních kmenů, způsobujících mastitidu u skotu, k vybraným štěpeným palmovým olejům bohatým na MCFA. MIK nabývají hodnot v rozmezí koncentrací 64 (*Str. agalactiae*) – 8192 $\mu\text{g/ml}$ (*S. aureus*). Nejcitlivějším z testovaných bakteriálních kmenů na základě nejnižší naměřené modální hodnoty MIK byl *Str. agalactiae* CCM 6178 (64 $\mu\text{g/ml}$ v případě hydrolyzovaného palmojádrového oleje), následovaný *Str. agalactiae* DSM 6784 a *Str. uberis* DSM 20569 (128 $\mu\text{g/ml}$ v případě štěpeného tucuma a palmojádrového oleje). Naopak nejméně citlivým se vůči aktivitě štěpených palmových olejů bohatých na MCFA jeví bakteriální druh *S. aureus*, který byl inhibován v rozmezí MIK 2048–8192 $\mu\text{g/ml}$. Bakteriální kmeny *S. aureus* pocházející z České kolekce mikroorganismů (CCM) byly v rámci testovaných kmenů také nejméně citlivé na antibakteriální působení penicilinu G (MIK 0,001953 $\mu\text{g/ml}$). Nejúčinnějším palmovým olejem hydrolyzovaným lipázou z *M. javanicus* se dle nejnižší naměřené hodnoty MIK jeví palmojádrový olej, jenž inhiboval růst *Str. agalactiae* CCM 6187 již v koncentraci 64 $\mu\text{g/ml}$, a zároveň potlačil růst *Str. uberis* DSM 20569 v koncentraci 128 $\mu\text{g/ml}$, stejně jako tucuma olej kmen *Str. agalactiae* DSM 6784. Tucuma olej dále také inhiboval růst dalšího kmene *Str. agalactiae* (CCM 6187) v koncentraci 256 $\mu\text{g/ml}$, shodně jako palmojádrový a kokosový olej *Str. agalactiae* DSM 6784. Růst *Str. dysgalactiae* DSM 20662 byl inhibován štěpeným tucuma olejem v koncentraci 1024 $\mu\text{g/ml}$ a kokosovým i palmojádrovým olejem v koncentraci 2048 $\mu\text{g/ml}$.

Tabulka 2: Minimální inhibiční koncentrace (MIK) testovaných štěpených palmových olejů ($\mu\text{g/ml}$).

Bakteriální kmen		MIK [$\mu\text{g/mL}$] ¹			
		kokosový olej	palmojádrový olej	tucuma olej	penicillin G
<i>S. aureus</i>	CCM 4442	2048	2048	2048	0,001953
	CCM 6188	8192	4096	4096	0,001953
	DSM 6732	8192	4096	4096	0,000244
<i>Str. agalactiae</i>	CCM 6187	1024	64	256	0,000244
	DSM 6784	256	256	128	0,00049
<i>Str. dysgalactiae</i>	DSM 20662	2048	2048	1024	0,000488
<i>Str. uberis</i>	CCM 4617	2048	1024	2048	0,000488
	DSM 20569	512	128	512	0,000977

¹ modus triplikátů tří nezávislých experimentů

Obrázek 2: Příklad vizualizace výsledků mikrodiluční bujónové metody v 96ti jamkové mikrotitrační destičce pro testování antibakteriální aktivity palmových olejů bohatých na středně mastné po štěpení lipázou z *Mucor javanicus* vůči bakterii *Staphylococcus aureus* DSM 6732.



3.3. Diskuze

Zvyšující se bakteriální rezistence vůči léčivům vedla ve státech EU k zákazu používání antibiotických stimulátorů růstu v chovech hospodářských zvířat (nařízení Evropského parlamentu a Rady ES č. 1831/2003 ze dne 22. září 2003 o doplňkových látkách pro použití u zvířat výživa). K této restrikci navíc s účinností od 28. ledna 2022 vstupuje v platnost Nařízení (EU) 2019/6 o veterinárních léčivých přípravcích a o zrušení směrnice 2001/82/ES, které mimo jiné zavádí zákaz preventivního používání antibiotik ve skupinách zvířat, zákaz preventivního používání antimikrobik v medikovaném krmivu, omezení používání antimikrobik jako kontrolní léčby k prevenci dalšího šíření nákazy, posílený zákaz používání antimikrobik na podporu růstu a zvýšení produkce (navíc k zákazu z roku 2006 týkajícího se používání antibiotik jako promotorů růstu v krmivu), a možnost vyhradit některá antimikrobika pouze pro člověka.

Vzhledem k těmto nařízením, reflektujícím potenciál nebezpečí šíření genů rezistence na antibiotika mezi bakteriálními kmeny způsobujícími mastitidu u skotu, je nutné hledat nové přírodní antibakteriální sloučeniny působící specificky proti patogenům způsobujícím mastitidu. Kyseliny se střední délkou řetězce (MCFA) lze nalézt nejen v rostlinných tucích, ale i v dalších v přírodních produktech, jako je mléko. Jsou netoxické pro sliznice, přičemž jsou schopné inhibovat širokou škálu lidských a zvířecích patogenů (Churchward et al. 2018). Kromě toho jsou všechny MCFA, jejich triglyceridy a kokosový olej definovány jako bezpečné pro použití ve výživě lidí a mají tzv. GRAS (generally recognised as safe) status, což znamená, že jsou obecně považovány za bezpečné pro použití ve výživě lidí (FDA 2019).

Je již známo, že řada biologických činidel má *in vitro* antibakteriální aktivitu proti nakažlivým i environmentálním kmenům způsobujícím bovinní mastitidu. Mezi tyto látky patří výtažky z různých rostlin, jako je *Alternanthera brasiliana* (plevuňka brazilská), *Achillea millefolium* (řebříček obecný), *Baccharis trimera* (pomíšenka), *Cedrus deodara* (cedr himálajský), *Curcuma longa* (kurkuma dlouhá), *Eucalyptus globulus* (blahovičník kulatoplodý), *Ocimum sanctum* (bazalka posvátná), *Origanum vulgare* (dobromysl obecná), *Solidago chilensis* (zlatobýl), či *Thymus vulgaris* (mateřídouška obecná) (Mushtaq et al. 2018).

Je známo, že MCFA mají *in vitro* antibakteriální vlastnosti vůči různým patogenům, ale studie o antibakteriálních vlastnostech palmových olejů bohatých na MCFA proti stafylokokům a streptokokům způsobujícím bovinní mastitidu jsou velice limitované. Batovska et al. (2009) vyhodnocovala antibakteriální aktivitu MCFA vůči *S. aureus* 209, *S. aureus* 146 MR a

S. aureus ATCC 33862 USA pomocí agarové difúzní jamkové metody a zjistila, že kyselina kaprinová inhibuje všechny tři testované kmeny v koncentracích 250–500 µg/ml, a že kyselina laurová inhibuje *S. aureus* 209 v koncentraci 125 µg/ml. Schlievert a Peterson (2012) dále hodnotili inhibiční aktivitu kyseliny laurové ve formě glycerolmonolaurátu (monolaurin) proti 54 různým kmenům *S. aureus* a zjistili, že jeho MIK odpovídá hodnotě 300 µg/ml. Tyto koncentrace inhibující růst stafylokoků jsou přibližně 10x nižší než v případě štěpených palmových olejů testovaných v této studii (2048–8192 µg/ml). Protože palmové oleje jsou nejen rozmanité kombinace mastných kyselin, včetně MCFA, ale také tokoferolů, polyfenolů, fytosterolů a fenolických kyselin (Srivastava et al. 2016), lze předpokládat, že tyto sloučeniny interagují díky svým mechanismům účinku, a tím snižují antibakteriální aktivitu samotných olejů. Dalším důvodem pro snížení antibakteriální aktivity palmových olejů ve srovnání s čistými MCFA může být jejich neúplné uvolnění z triglyceridů během štěpení lipázou. Tato skutečnost byla potvrzena ve studii Naira (2005), kde růst 15 klinických izolátů patogenů způsobujících mastitidu, včetně *S. aureus*, *Str. agalactiae*, *Str. dysgalactiae* a *Str. uberis* byl inhibován kyselinou kaprylovou a monokaprylinem. Autoři dospěli k závěru, že nejúčinnější koncentrací inhibující v autoklávovaném mléce výše uvedené izoláty způsobující mastitidu bylo 100 mM kyseliny kaprylové a 50 mM monokaprylinu. Monolaurin je účinný proti růstu *Str. agalactiae*, jak ukazují ve své studii Schlievert a Peterson (2012), kde vykázal monolaurin glukózy antibakteriální aktivitu proti třem kmenům této bakterie při MIK 30 µg/ml. V předkládané studii byla účinná koncentrace kokosového oleje proti *Str. agalactiae* CCM 6178 až 34x vyšší než u monolaurinu glukózy, ale pouze dvakrát vyšší proti stejnému bakteriálnímu kmenu v případě palmojadrového oleje. Tento rozdíl může být způsoben rozdílným stupněm hydrolyzy v obou olejích během procesu štěpení. Citlivost *S. aureus* k antibakteriálnímu působení štěpených olejů byla významně nižší než citlivost jiných bakteriálních druhů nejen v této studii – průměrná MIK vůči *S. aureus* 13x vyšší než u kmenů *Str. agalactiae* –, ale také v jiných studiích, jak je uvedeno výše. Lze předpokládat, že pravděpodobný důvod rezistence *S. aureus* může být způsoben jeho obalem, který je tvořen exopolysacharidy, jelikož bylo také prokázáno, že se produkce slizu vyskytuje u kmenů způsobujících mastitidu (Baselga et al. 1994).

Jelikož je známá souvislost mezi kontaminací vemene bakteriemi způsobujícími mastitidu a hygienou (Schreiner a Ruegg 2003), v praxi se používají různé postupy dezinfekce struků před a po dojení. Zejména po dojení jsou nejčastěji používána ošetření na bázi jódu (jodofory) a chlorhexidinu; bakterie však vůči oběma typům těchto dezinfekčních prostředků získávají vyšší

odolnost (Behiry et al. 2012). Antibakteriální vlastnosti rostlinných olejů bohatých na MCFA proti patogenům způsobujícím mastitidu jsou proto žádoucí. Výhoda rostlinných olejů bohatých na MCFA spočívá v jejich pozitivním vlivu na stav pokožky (Oyediji a Okeke 2010), a také v jejich antibakteriální aktivitě, a proto může být jejich použití prospěšné v rámci přípravy a ošetření struku během procesu dojení.

4. Závěr

Potenciální zdravotní riziko přenosu patogenních bakteriálních kmenů rezistentních na antibiotika z potravinových zvířat vedou k potřebě nových alternativ antibakteriálních zdrojů v mlékárenském průmyslu. V této studii byl *in vitro* pozorován antibakteriální účinek palmových olejů bohatých na MCFA, jmenovitě kokosového, palmojádrového, a tucuma oleje (po štěpení lipázou z *Mucor javanicus*), vůči osmi kmenům bakteriálních patogenů způsobujících mastitidu skotu. Výsledky nabízejí alternativní přístup k prevenci mastitid ve stádech skotu, protože oleje bohaté na MCFA jsou cenné antibakteriální prostředky vhodné pro použití při přípravě a ošetření struku během procesu dojení. Je však žádoucí, aby praktická aplikace zjištěných výsledků byla potvrzena v *in vivo* studiích.

5. Reference

- Abdullahi O, Karani A, Tigoi CC, Mugo D, Kungu S, Wanjiru E, Jomo J, Musyimi R, Lipsitch M, Scott JAG. 2012. The prevalence and risk factors for pneumococcal colonization of the nasopharynx among children in Kilifi District, Kenya. *PLOS ONE* (e30787). doi: 10.1371/journal.pone.0030787.
- Abranches J, Zeng L, Kajfasz JK, Palmer S, Chakraborty B, Wen Z, Richards VP, Brady LJ, Lemos JA. 2019. Biology of Oral Streptococci. *Microbiology Spectrum* (e6). doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0042-2018.
- Akuzawa N, Kurabayashi M. 2016. Bacterial pneumonia caused by *Streptococcus pyogenes* infection: a case report and review of the literature. *Journal of Clinical Medicine Research* **8**, 831–835. doi: 10.14740/jocmr2737w.
- Alves-Barroco C, Rivas-García L, Fernandes AR, Baptista PV. 2020. Tackling multidrug resistance in Streptococci—From novel biotherapeutic strategies to nanomedicines. *Frontiers in Microbiology* (579916). doi: 10.3389/fmicb.2020.579916.
- Anushree S, André M, Guillaume D, Frédéric F. 2017. Stearic sunflower oil as a sustainable and healthy alternative to palm oil. A review. *Agronomy for Sustainable Development* (18). doi: 10.1007/s13593-017-0426-x.
- Aucken HM, Ganner M, Murchan S, Cookson BD, Johnson AP. 2002. A new UK strain of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (EMRSA-17) resistant to multiple antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **50**, 171–175. doi: 10.1093/jac/dkf117.
- Azooz MF, El-Wakeel SA, Yousef HM. 2020. Financial and economic analyses of the impact of cattle mastitis on the profitability of Egyptian dairy farms. *Veterinary World* (1750). doi: 10.14202/vetworld.2020.1750-1759.
- Ba X, Harrison EM, Lovering AL, Gleadall N, Zadoks R, Parkhill J, 2015. Old drugs to treat resistant bugs: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates with mecC are susceptible to a combination of penicillin and clavulanic acid. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **59**, 7396–7404. doi: 10.1128/AAC.01469-15.
- Baldassarri L, Creti R, Recchia S, Imperi M, Facinelli B, Giovanetti E, Pataracchia M, Alfarone G, Orefici G. 2006. Therapeutic failures of antibiotics used to treat macrolide-susceptible

Streptococcus pyogenes infections may be due to biofilm formation. *Journal of Clinical Microbiology* **44**, 2721–2727. doi: 10.1128/JCM.00512-06.

Baquero F. 1997. Gram-positive resistance: challenge for the development of new antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **39**, 1–6. doi: 10.1093/jac/39.suppl_1.1.

Barkema HW, Green MJ, Bradley AJ, Zadoks RN. 2009. Invited review: The role of contagious disease in udder health. *Journal of Dairy Science* **92**, 4717–4729. doi: 10.3168/jds.2009-2347.

Baselga R, Albizu I, Amorena B. 1994. *Staphylococcus aureus* capsule and slime as virulence factors in ruminant mastitis. A review. *Veterinary Microbiology* **39**, 195–204. doi: 10.1016/0378-1135(94)90157-0.

Batovska DI, Todorova T, Tsvetkova V, Najdenski HM. 2009. Antibacterial study of the medium chain fatty acids and their 1-monoglycerides: individual effects and synergistic relationships. *Polish Journal of Microbiology* **58**, 43–47.

Behiry AE, Schlenker G, Szabo I, Roesler U. 2012. *In vitro* susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with subclinical mastitis to different antimicrobial agents. *Journal of Veterinary Science* **13**, 153–161. doi: 10.4142/jvs.2012.13.2.153.

Bergsson G, Arnfinnsson J, Steingrímsson Ó, Thormar H. 2001. Killing of Gram-positive cocci by fatty acids and monoglycerides. *APMIS* **109**, 670–678. doi: 10.1034/j.1600-0463.2001.d01-131.x.

Bhattacharya M, Wozniak DJ, Stoodley P, Hall-Stoodley L. 2015. Prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* **13**, 1499–1516. doi: 10.1586/14787210.2015.1100533.

Bhosale RR, Osmani RA, Ghodake PP, Shaikh SM, Chavan SR. 2014. Mastitis: an intensive crisis in veterinary science. *International Journal of Pharma Research and Health Sciences* **2**, 96–103.

Bhuvana M, Shome BR. 2013. Etiology of bovine mastitis. In: *Proceedings of Model Training Course on “Bovine Mastitis: Theoretical and Practical Consideration in Management”*, Bangalore, India, 7–10.

Bomba A, et al. 2006. The improvement of probiotics efficacy by synergistically acting components of natural origin: a review. *Biologia* **61**, 729–734. doi: 10.2478/s11756-006-0149-y.

- Bonten MJ, Austin DJ, Lipsitch M. 2001. Understanding the spread of antibiotic resistant pathogens in hospitals: mathematical models as tools for control. *Clinical Infectious Diseases* **33**, 1739–1746. doi: 10.1086/323761.
- Breen J. 2017. The importance of non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) in mastitis therapeutics. *Livestock* **4**, 182–185. doi: 10.12968/live.2017.22.4.182.
- Camara M, Dieng A, Boye CSB. 2013. Antibiotic susceptibility of *Streptococcus pyogenes* isolated from respiratory tract infections in Dakar, Senegal. *Microbiology Insights (S12996)*. doi: 10.4137/MBI.S12996.
- Cavassani KA, Ishii M, Wen H, Schaller MA, Lincoln PM, Lukacs NW, Hogaboam CM, Kunkel SL. 2008. TLR3 is an endogenous sensor of tissue necrosis during acute inflammatory events. *Journal of Experimental Medicine* **205**, 2609–2621. doi: 10.1084/jem.20081370.
- CDC. 2019. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA. Available from www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf (accessed February 2021).
- Clauditz A, Resch A, Wieland KP, Peschel A, Götz F. 2006. Staphyloxanthin plays a role in the fitness of *Staphylococcus aureus* and its ability to cope with oxidative stress. *Infection and Immunity* **74**, 4950–4953. doi: 10.1128/IAI.00204-06.
- CLSI. 2013. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard M07-A10, 10th Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Collins LV, Kristian SA, Weidenmaier C, Faigle M, Van Kessel KP, Van Strijp JA, Gotz F, Neumeister B, Peschel A. 2002. *Staphylococcus aureus* strains lacking D-alanine modifications of teichoic acids are highly susceptible to human neutrophil killing and are virulence attenuated in mice. *Journal of Infectious Diseases* **186**, 214–219. doi: 10.1086/341454.
- Cormican MG, Jones RN. 1996. Emerging resistance to antimicrobial agents in gram-positive bacteria: enterococci, staphylococcus and nonpneumococcal streptococci. *Drugs* **51**, 6–12. doi: 10.2165/00003495-199600511-00004.
- Cunningham MW. 2000. Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clinical Microbiology Reviews* **13**, 470–511. doi: 10.1128/CMR.13.3.470.

Dai J, Han R, Xu Y, Li N, Wang J, Dan W. 2020. Recent progress of antibacterial natural products: future antibiotics candidates. *Bioorganic Chemistry* (103922). doi: 10.1016/j.bioorg.2020.103922.

David MZ, Daum RS. 2010. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clinical Microbiology Reviews* **23**, 616–87. doi: 10.1128/CMR.00081-09.

de Souza Guedes L, Jardim ICSF, de Melo LV, Beppu MM, Breikreitz MC, Santana CC. 2017. Study of the effect of the operating parameters on the separation of bioactive compounds of palm oil by ultra-high performance supercritical fluid chromatography using a design of experiments approach. *Canadian Journal of Chemical Engineering* **95**, 2306–2314.

Desbois AP, Smith VJ. 2010. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* **85**, 1629–1642. doi: 10.1007/s00253-009-2355-3.

Downey JS, Mashburn-Warren L, Ayala EA, Senadheera DB, Hendrickson WK, McCall LW, Sweet JG, Cvitkovitch DG, Spatafora GA, Goodman SD. 2014. *In vitro* manganese-dependent cross-talk between *Streptococcus mutans* VicK and GcrR: implications for overlapping stress response pathways. *PLOS ONE* (e115975). doi: 10.1371/journal.pone.0115975.

Drechsel H, Freund S, Nicholson G, Haag H, Jung O, Zahner H, Jung G. 1993. Purification and chemical characterization of staphyloferrin B, a hydrophilic siderophore from staphylococci. *Biometals* **6**, 185–192. doi: 10.1007/BF00205858.

Dufour S, Labrie J, Jacques M. 2019. The mastitis pathogens culture collection. *Microbiology Resource Announcements* (e00133–19). doi: 10.1128/MRA.00133-19.

EFSA, ECDC. 2019. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017. *EFSA Journal* (5598). doi: 10.2903/j.efsa.2019.5598.

Elliott DJ, Zaoutis TE, Troxel AB, Loh A, Keren R. 2009. Empiric antimicrobial therapy for pediatric skin and soft-tissue infections in the era of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pediatrics* (e959–e966). doi: 10.1542/peds.2008-2428.

Emami NK, Samie A, Rahmani HR, Ruiz-Feria CA. 2012. The effect of peppermint essential oil and fructooligosaccharides, as alternatives to virginiamycin, on growth performance,

digestibility, gut morphology and immune response of male broilers. *Animal Feed Science and Technology* **175**, 57–64. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2012.04.001.

EMA. 2017. Questions and answers on veterinary medicinal products containing zinc oxide to be administered orally to food-producing species: Outcome of a referral procedure under Article 35 of Directive 2001/82/EC (EMA/V/A/118). European Medicines Agency, London.

Era M, Sakai S, Tanaka A, Kawahara T, Kanyama T, Morita, H. 2015. Antifungal Activity of Fatty Acid Salts Against *Penicillium pinophilum*. *Japan Journal of Food Engineering* **16**, 99–108. doi: 10.1051/mateconf/20166203002.

EU. 2003. Nařízení č. 1831/2003/CE o doplňkových látkách používaných ve výživě zvířat. Pages 29-43 in Úřední věstník Evropské unie L268. Evropská unie.

EU. 2019. Nařízení č. 2019/6 o veterinárních léčivých přípravcích a o zrušení směrnice 2001/82/ES. Pages 1-125 in Úřední věstník Evropské unie L4/43. Evropská unie.

Faciola AP, Broderick GA. 2014. Effects of feeding lauric acid or coconut oil on ruminal protozoa numbers, fermentation pattern, digestion, omasal nutrient flow, and milk production in dairy cows. *Journal of Dairy Science* **97**, 5088–5100. doi: 10.3168/jds.2013-7653.

Facklam R. 2002. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clinical Microbiology Reviews* **15**, 613–630. doi: 10.1128/CMR.15.4.613-630.2002.

FDA. 2019. Electronic Code of Federal Regulations. U.S. Food and Drug Administration, College Park, USA. Available at: https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=3ee286332416f26a91d9e6d786a604ab&mc=true&tpl=/ecfrbrowse/Title21/21tab_02.tpl (accessed Feb 25, 2019).

Fitzgerald JR. 2012. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*: origin, evolution and public health threat. *Trends in Microbiology* **20**, 192–198. doi: 10.1016/j.tim.2012.01.006.

Foster TJ. 2005. Immune evasion by staphylococci. *Nature Reviews Microbiology* **3**, 948–958. doi: 10.1038/nrmicro1289.

Froehlich BJ, Bates C, Scott JR. 2009. *Streptococcus pyogenes* CovRS mediates growth in iron starvation and in the presence of the human cationic antimicrobial peptide LL-37. *Journal of Bacteriology* **191**, 673–677. doi: 10.1128/JB.01256-08.

- García-Álvarez L, et al. 2011. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *The Lancet Infectious Diseases* **11**, 595–603. doi: 10.1016/S1473-3099(11)70126-8.
- Geng CY, Zhang M, Li CY, Jin YH, Yan CG, Jin Y. 2016. Effectiveness of medium-chain fatty acids on feed intake and weight gain in animal: Depending on balance. *Indian Journal of Animal Research* **50**, 885–892. doi: 10.18805/IJAR.V0IOF.4554.
- Gerber MA, Baltimore RS, Eaton CB, Gewitz M, Rowley AH, Shulman ST, Taubert KA. 2009. Prevention of rheumatic fever and diagnosis and treatment of acute *Streptococcal pharyngitis*: a scientific statement from the American Heart Association Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young, the Interdisciplinary Council on Functional Genomics and Translational Biology, and the Interdisciplinary Council on Quality of Care and Outcomes Research: endorsed by the American Academy of Pediatrics. *Circulation* **119**, 1541–1551. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.191959.
- Getaneh AM, Mekonnen SA, Hogeveen H. 2017. Stochastic bio-economic modeling of mastitis in Ethiopian dairy farms. *Preventive Veterinary Medicine* **138**, 94–103. doi: 10.1016/j.prevetmed.2017.01.014.
- Ghasemi HA, Kasani N, Taherpour K. 2014. Effects of black cumin seed (*Nigella sativa* L.), a probiotic, a prebiotic and a synbiotic on growth performance, immune response and blood characteristics of male broilers. *Livestock Science* **164**, 128–134. doi: 10.1016/j.livsci.2014.03.014.
- Gohel V, Singh A, Vimal M, Ashwini P, Chhatpar HS. 2006. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. *African Journal of Biotechnology* **5**, 54–72.
- Gomes F, Henriques M. 2016. Control of bovine mastitis: Old and recent therapeutic approaches. *Current Microbiology* **72**, 377–382. doi: 10.1007/s00284-015-0958-8.
- Gruet P, Maincent P, Berthelot X, Kaltsatos V. 2001. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews* **50**, 245–59. doi: 10.1016/s0169-409x(01)00160-0.
- Guardabassi L, Schmidt KR, Petersen TS, Espinosa-Gongora C, Moodley A, Agersø Y, Olsen JE. 2012. Mustelidae are natural hosts of *Staphylococcus delphini* group A. *Veterinary Microbiology* **159**, 351–53. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.04.004.

- Gulaboski R, Mirčeski V, Mitrev S. 2013. Development of a rapid and simple voltammetric method to determine total antioxidative capacity of edible oils. *Food Chemistry* **138**, 116–121. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.10.050.
- Gussmann M, Steeneveld W, Kirkeby C, Hogeveen H, Nielen M, Farre M, Halasa T. 2019. Economic and epidemiological impact of different intervention strategies for clinical contagious mastitis. *Journal of Dairy Science* **102**, 1483–1493. doi: 10.3168/jds.2018-14939
- Haag AF, Fitzgerald JR, Penadés JR. 2019. *Staphylococcus aureus* in Animals. *Microbiology Spectrum* **7**, 731–746. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0060-2019.
- Halasa T, Huijps K, Osteras O, Hogeveen H. 2007. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Veterinary Quarterly* **29**, 18–31.
- Halasa T, Nielen M, Huirne RBM, Hogeveen H. 2009. Stochastic bio-economic model of bovine intramammary infection. *Livestock Science* **124**, 295–305. doi: 10.1016/j.livsci.2009.02.019.
- Hanczakowska E, Szewczyk A, Okon K. 2011. Caprylic, capric and/or fumaric acids as antibiotic replacements in piglet feed. *Annals of Animal Science* **11**, 115–124.
- Hansen CF, Riis AL, Bresson S, Højbjerg O, Jensen BB. 2007. Feeding organic acids enhances the barrier function against pathogenic bacteria of the piglet stomach. *Livestock Science* **108**, 206–209. doi: 10.1016/j.livsci.2007.01.059.
- Hashimoto M, Tawaratsumida K, Kariya H, Kiyohara A, Suda Y, Krikae F, Kirikae T, Gotz F. 2006. Not lipoteichoic acid but lipoproteins appear to be the dominant immunobiologically active compounds in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Immunology* **177**, 3162–3169. doi: 10.4049/jimmunol.177.5.3162.
- Hasty DL, Ofek I, Courtney HS, Doyle RJ. 1992. Multiple adhesins of streptococci. *Infection and Immunity* **60**, 2147–2152. doi: 10.1128/iai.60.6.2147-2152.1992.
- Hossain MK, Paul S, Hossain MM, Islam MR, Alam MGS. 2017. Bovine mastitis and its therapeutic strategy doing antibiotic sensitivity test. *Austin Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry* **4**, 1030.
- Hovorková P, Laloučková K, Skřivanová E. 2018. Determination of *in vitro* antibacterial activity of plant oils containing medium-chain fatty acids against Gram-positive pathogenic and

gut commensal bacteria. Czech Journal of Animal Science **63**, 119–125. doi: 10.17221/70/2017-CJAS.

Howden BP, Davies JK, Johnson PD, Stinear TP, Grayson ML. 2010. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. Clinical Microbiology Reviews **23**, 99–139. doi: 10.1128/CMR.00042-09.

Hua CZ, Howard A, Malley R, Lu YJ. 2014. Effect of nonheme iron-containing ferritin Dpr in the stress response and virulence of pneumococci. Infection and Immunity **82**, 3939–3947. doi: 10.1128/IAI.01829-14.

Huang CB, Alimova Y, Myers TM, Ebersole JL. 2011. Short-and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. Archives of Oral Biology **56**, 650–654. doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.01.011.

Chambers HF. 2001. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*?. Emerging Infectious Diseases **7**, 178–182. doi: 10.3201/eid0702.010204.

Cheng AG, McAdow M, Kim HK, Bae T, Missiakas DM, Schneewind O. 2010. Contribution of coagulases towards *Staphylococcus aureus* disease and protective immunity. PLOS Pathogens (e1001036). doi: 10.1371/journal.ppat.1001036.

Chiu MC, de Morais Coutinho C, Gonçalves LAG. 2009. Carotenoids concentration of palm oil using membrane technology. Desalination **245**, 783–786. doi: 10.1016/j.desal.2009.03.002.

Churchward CP, Alany RG, Snyder LA. 2018. Alternative antimicrobials: the properties of fatty acids and monoglycerides. Critical Reviews in Microbiology **44**, 561–570. doi: 10.1080/1040841X.2018.1467875.

Ibrahim J, Eisen JA, Jospin G, Coil DA, Khazen G, Tokajian S. 2016. Genome analysis of *Streptococcus pyogenes* associated with pharyngitis and skin infections. PLOS ONE (e0168177). doi: 10.1371/journal.pone.0168177.

Jackman JA, Boyd RD, Elrod CC. 2020. Medium-chain fatty acids and monoglycerides as feed additives for pig production: towards gut health improvement and feed pathogen mitigation. Journal of Animal Science and Biotechnology **11**, 1–15. doi: 10.1186/s40104-020-00446-1.

Jamil S, Saad U, Hafiz S. 2017. Can amoxicillin clavulanate be used for treating MRSA?. Journal of Pharmacology Research **1**, 21–23.

- Jarriyawattanachaikul W, Chaveerach P, Chokesajjawatee N. 2016. Antimicrobial activity of Thai-herbal plants against food-borne pathogens *E. coli*, *S. aureus* and *C. jejuni*. Agriculture and Agricultural Science Procedia **11**, 20–24. doi: 10.1016/j.aaspro.2016.12.004.
- Jin T, Bokarewa M, Foster T, Mitchell J, Higgins J, Tarkowski A. 2004. *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. The Journal of Immunology **172**, 1169–1176. doi: 10.4049/jimmunol.172.2.1169.
- Kasna E, Zavadilova L, Stipkova M. 2018. Genetic evaluation of clinical mastitis traits in Holstein cattle. Czech Journal of Animal Science **63**, 443–451. doi: 10.17221/105/2018-CJAS.
- Khatibjoo A, Mahmoodi M, Fattahnia F, Akbari-Gharaei M, Shokri AN, Soltani S. 2018. Effects of dietary short-and medium-chain fatty acids on performance, carcass traits, jejunum morphology, and serum parameters of broiler chickens. Journal of Applied Animal Research **46**, 492–498. doi: 10.1080/09712119.2017.1345741.
- Kollanoor-Johny A, Mattson T, Baskaran SA, Amalaradjou MAR, Hoagland TA, Darre MJ, Khan MI, Schreiber DT, Donoghue AM, Donoghue DJ, Venkitanarayanan K. 2012. Caprylic acid reduces *Salmonella enteritidis* populations in various segments of digestive tract and internal organs of 3- and 6-week-old broiler chickens, therapeutically. Poultry Science **91**, 1686–1694. doi: 10.3382/ps.2011-01716.
- Kossaibati MA, Esslemont RJ. 1997. The costs of production diseases in dairy herds in England. Veterinary Journal **154**, 41–51. doi: 10.1016/S1090-0233(05)80007-3.
- Kromker V, Grabowski NT, Friedrich J. 2014. New infection rate of bovine mammary glands after application of an internal teat seal at dry-off. Journal of Dairy Research **81**, 54–58.
- Kubistova L, Dvoracek L, Tkadlec J, Melter O, Licha I. 2018. Environmental stress affects the formation of *Staphylococcus aureus* persists tolerant to antibiotics. Microbial Drug Resistance **24**, 547–555. doi: 10.1089/mdr.2017.0064.
- Lam MM, Clarridge JE, Young EJ, Mizuki S. 2007. The other group G *Streptococcus*: increased detection of *Streptococcus canis* ulcer infections in dog owners. Journal of Clinical Microbiology **45**, 2327–2329. doi: 10.1128/JCM.01765-06.
- Lancefield RC. 1933. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. The Journal of Experimental Medicine **57**, 571–595. doi: 10.1084/jem.57.4.571.

- Lemke SL, Mayura K, Reeves WR, Wang N, Fickey C, Phillips TD. 2001. Investigation of organophilic montmorillonite clay inclusion in zearalenonecontaminated diets using the mouse uterine weight bioassay. *Journal of Toxicology and Environmental Health* **62**, 243–258. doi: 10.1080/009841001459405.
- Liaw S-J, Lai H-C, Wang W-B. 2004. Modulation of swarming and virulence by fatty acids through the RsbA protein in *Proteus mirabilis*. *Infection and Immunity* **72**, 6836–6845. doi: 10.1128/IAI.72.12.6836-6845.2004.
- Liu GY. 2009. Molecular pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infection. *Pediatric Research* (71R-77R). doi: 10.1203/PDR.0b013e31819dc44d.
- Liu Y, Li R, Xiao X, Wang Z. 2019. Antibiotic adjuvants: an alternative approach to overcome multi-drug resistant Gram-negative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology* **45**, 301–314. doi: 10.1080/1040841X.2019.1599813.
- Maresso AW, Schneewind O. 2006. Iron acquisition and transport in *Staphylococcus aureus*. *Biometals* **19**, 193–203. doi: 10.1007/s10534-005-4863-7.
- Marinho M, Lordelo M, Cunha L, Freire J. 2007. Microbial activity in the gut of piglets: I. Effect of prebiotic and probiotic supplementation. *Livestock Science* **108**, 236–239.
- McGaw LJ, Jäger AK, Van Staden J, Houghton PJ. 2002. Antibacterial effects of fatty acids and related compounds from plants. *South African Journal of Botany* **68**, 417–423.
- McGrattan CJ, Sullivan JD, Ikawa M. 1976. Inhibition of chlorella (chlorophyceae) growth by fatty acids, using the paper disc method. *Journal of Phycology* **12**, 129–131. doi: 10.1111/j.1529-8817.1976.tb02839.x.
- McInerney JP, Howe KS, Schepers JA. 1992. A framework for the economic analysis of disease in farm livestock. *Prevent. Veterinary Medicine* **13**, 137–154. doi: 10.1016/0167-5877(92)90098-Z.
- Melo-Cristino J, Resina C, Manuel V, Lito L, Ramirez M. 2013. First case of infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *The Lancet* **382**, 205. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61219-2.
- Mushtaq S, Shah AM, Shah A, Lone SA, Hussain A, Hassan QP, Ali MN. 2018. Bovine mastitis: An appraisal of its alternative herbal cure. *Microbial Pathogenesis* **114**, 357–361. doi: 10.1016/j.micpath.2017.12.024.

- Nair MKM, Joy J, Vasudevan P, Hinckley L, Hoagland TA, Venkitanarayanan KS. 2005. Antibacterial effect of caprylic acid and monocaprylin on major bacterial mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science* **88**, 3488–3495. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(05)73033-2.
- Neu HC. 1992. The crisis in antibiotic resistance. *Science* **257**, 1064–1073. doi: 10.1126/science.257.5073.1064.
- Newman DJ, Cragg GM. 2020. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products* **83**, 770–803. doi: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285.
- Newsom SWB. 2008. Ogston's coccus. *Journal of Hospital Infection* **70**:369-372.
- Nguyen DH, Kim IH. 2020. Protected Organic Acids Improved Growth Performance, Nutrient Digestibility, and Decreased Gas Emission in Broilers. *Animals* (416). doi: 10.3390/ani10030416.
- Novick RP. 2003. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Molecular Microbiology* **48**, 1429–1449. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03526.x.
- O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, Lee E, Mulholland K, Levine OS, Cherian T. 2009. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet* **374**, 893–902. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61204-6.
- Ostrowsky B, Rosenthal VD. 2018. Guide to infection control in the healthcare setting *Streptococcus pyogenes* (Group A Streptococcal Infections). International Society for Infectious Diseases Brookline, MA.
- Oyedeji FO, Okeke IE. 2010. Comparative analysis of moisturizing creams from vegetable oils and paraffin oil. *Research Journal of Applied Sciences* **5**, 157–160. doi: 10.3923/rjasci.2010.157.160.
- Parks T, Barrett L, Jones N. 2015. Invasive streptococcal disease: a review for clinicians. *British Medical Bulletin* **115**, 1–13. doi: 10.1093/bmb/ldv027.
- Peng QY, Li JD, Li Z, Duan ZY, Wu YP. 2016. Effects of dietary supplementation with oregano essential oil on growth performance, carcass traits and jejunal morphology in broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology* **214**, 148–153. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2016.02.010.

Peyrusson F, Varet H, Nguyen TK, Legendre R, Sismeiro O, Coppée J-Y, Wolz C, Tenson T, Van Bambeke F. 2020. Intracellular *Staphylococcus aureus* persists upon antibiotic exposure. *Nature Communication* **11**, 1–14. doi: 10.1038/s41467-020-15966-7.

Raabe VN, Shane AL. 2019. Group B streptococcus (*Streptococcus agalactiae*). Page 228-238 in Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Braunstein M, Rood JJ, editors. *Gram-Positive Pathogens*. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Rato MG, Nerlich A, Bergmann R, Bexiga R, Nunes SF, Vilela CL, Santos-Sanches I, Chhatwal GS. 2011. Virulence gene pool detected in bovine group C *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* isolates by use of a group A *S. pyogenes* virulence microarray. *Journal of Clinical Microbiology* **49**, 2470–2479. doi: 10.1128/JCM.00008-11.

Rello J, Eshwara VK, Lagunes L, Alves J, Wunderink RG, Conway-Morris A, Rojas JN, Alp E, Zhang Z. 2019. A global priority list of the TOp TEn resistant Microorganisms (TOTEM) study at intensive care: a prioritization exercise based on multi-criteria decision analysis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **38**, 319–323. doi: 10.1007/s10096-018-3428-y.

Rice LB. 2006. Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. *American Journal of Infection Control (S11-S19)*. doi: 10.1016/j.amjmed.2006.03.012.

Roselli M, Finamore A, Britti MS, Bosi P, Oswald I, Mengheri E. 2005. Alternatives to in-feed antibiotics in pigs: Evaluation of probiotics, zinc or organic acids as protective agents for the intestinal mucosa. A comparison of *in vitro* and *in vivo* results. *Animal Research* **54**, 203–218. doi: 10.1051/animres:2005012.

Rosenbach FJ. 1884. Microorganismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen. Pages 1-122 in Bergmann JF editor. *Bergmann's Verlag*. Verlag, Wiesbaden.

Ruegg PL. 2003. Practical food safety interventions for dairy production. *Journal of Dairy Science (E1–E9)*. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(03)74034-X.

Ruzin A, Novick RP. 2000. Equivalence of lauric acid and glycerol monolaurate as inhibitors of signal transduction in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* **182**, 2668–2671. doi: 10.1128/JB.182.9.2668-2671.2000.

- Sado-Kamdem SL, Vannini L, Guerzoni ME. 2009. Effect of alpha-linolenic, capric and lauric acid on the fatty acid biosynthesis in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology* **129**, 288–294. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.010.
- Saleem M, Nazir M, Ali MS, Hussain H, Lee YS, Riaz N, Jabbar A. 2010. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. *Natural Product Reports* **27**, 238–254. doi: 10.1039/b916096e.
- Scheibner KA, Lutz MA, Boodoo S, Fenton MJ, Powell JD, Horton MR. 2006. Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *The Journal of Immunology* **177**, 1272–1281. doi: 10.4049/jimmunol.177.2.1272.
- Schleifer KH, Bell JA. 2009. Genus *Staphylococcus*. Pages 392-421 in Whitman WB editor. *Bergey's Manual of Systematics Bacteriology; Volume 3: The Firmicutes*. Springer, New York.
- Schlievert PM, Peterson ML. 2012. Glycerol monolaurate antibacterial activity in broth and biofilm cultures. *PLOS ONE* (e40350). doi: 10.1371/journal.pone.0040350.
- Schreiner DA, Ruegg PL. 2003. Relationship between udder and leg hygiene scores and subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science* **86**, 3460–3465. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(03)73950-2.
- Schroeder J. 2012. Bovine mastitis and milking management [online]. North Dakota State University. Available at: www.ag.ndsu.edu/pubs/ansci/dairy/as1129.pdf (accessed on Jun 29, 2020).
- Sieprawska-Lupa M, et al. 2004. Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**, 4673–4679. doi: 10.1128/AAC.48.12.4673-4679.2004.
- Silva JG, Alcantara AM, Mota RA. 2018. Bovine mastitis caused by *Staphylococcus* spp. Methicillin-resistant: Literature review. *Pesquisa Veterinária Brasileira* **38**, 223–228. doi: 10.1590/1678-5150-PVB-4996.
- Silversides JA, Lappin E, Ferguson AJ. 2010. Staphylococcal toxic shock syndrome: mechanisms and management. *Current Infectious Disease Reports* **12**, 392–400. doi: 10.1007/s11908-010-0119-y.
- Skřivanová E, Molatová Z, Matěnová M, Houf K, Marounek M. 2011. Inhibitory effect of organic acids on arcobacters in culture and their use for control of *Arcobacter butzleri* on

chicken skin. *International Journal of Food Microbiology* **144**, 367–371. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.021.

Suce PJ, Bartley DJ, Zadoks RN, Macleod M. 2016. Livestock health and greenhouse gas emissions. In: *ClimateXChange is Scotland's Centre of Expertise on Climate Change*. Available at: https://www.climateexchange.org.uk/media/2031/livestock_health_and_ghg.pdf. (accessed on May 20, 2021).

Srivastava Y, Semwal AD, Majumdar A. 2016. Quantitative and qualitative analysis of bioactive components present in virgin coconut oil. *Cogent Food & Agriculture* (1164929). doi: 10.1080/23311932.2016.1164929.

Steenefeld W, van Werven T, Barkema HW, Hogeveen H. 2011. Cow-specific treatment of clinical mastitis: An economic approach. *Journal of Dairy Science* **94**, 174–188. doi: 10.3168/jds.2010-3367.

Ster C, Allard M, Boulanger S, Boulet ML, Mulhbachter J. 2013. Experimental treatment of *Staphylococcus aureus* bovine intramammary infection using a guanine riboswitch ligand analog. *Journal of Dairy Science* **96**, 1000–1008. doi: 10.3168/jds.2012-5890.

Swinkels JM, Rooijendijk JG, Zadoks RN, Hogeveen H. 2005. Use of partial budgeting to determine the economic benefits of antibiotic treatment of chronic SCM caused by *Streptococcus uberis* or *Streptococcus dysgalactiae*. *Journal of Dairy Research* **72**, 75–85. doi: 10.1017/s0022029904000603.

Tabuchi F, Matsumoto Y, Ishii M, Tatsuno K, Okazaki M, Sato T, Moriya K, Sekimizu K. 2017. Synergistic effects of vancomycin and β -lactams against vancomycin highly resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antibiotics* **70**, 771–774. doi: 10.1038/ja.2017.7.

Thomer L, Schneewind O, Missiakas D. 2016. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* bloodstream infections. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **11**, 343–364. doi: 10.1146/annurev-pathol-012615-044351.

Thormar H, Hilmarsson H, Bergsson G. 2006. Stable concentrated emulsions of the 1-monoglyceride of capric acid (monocaprin) with microbicidal activities against the food-borne bacteria *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 522–526. doi: 10.1128/AEM.72.1.522-526.2006.

- Toghyani M, Toghyani M, Gheisari A, Ghalamkari G, Eghbalsaied S. 2011. Evaluation of cinnamon and garlic as antibiotic growth promoter substitutions on performance, immune responses, serum biochemical and haematological parameters in broiler chicks. *Livestock Science* **138**, 167–173. doi: 10.1016/j.livsci.2010.12.018.
- Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. 2015. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews* **28**, 603–661. doi: 10.1128/CMR.00134-14.
- Trainor VC, Udy RK, Bremer PJ, Cook GM. 1999. Survival of *Streptococcus pyogenes* under stress and starvation. *FEMS Microbiology Letters* **176**, 421–428. doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13692.x.
- Tremblay YD, Caron V, Blondeau A, Messie S, Jacques M. 2014. Biofilm formation by coagulase-negative staphylococci: Impact on the efficacy of antimicrobials and disinfectants commonly used on dairy farms. *Veterinary Microbiology* **172**, 511–518. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.06.007.
- Ubgogu O, Onyeagba R, Chigbu O. 2006. Lauric acid content and inhibitory effect of palm kernel oil on two bacterial isolates and *Candida albicans*. *African Journal of Biotechnology* **5**, 1045–1047.
- Utsui Y, Yokota T. 1985. Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **28**, 397–403. doi: 10.1128/aac.28.3.397.
- Van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, Grenfell BT, Levin SA, Robinson TP, Teillant A, Laxminarayan R. 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, 5649–5654. doi: 10.1073/pnas.1503141112.
- Wang J, et al. 2020. Discovery of Novel Antibiotics as Covalent Inhibitors of Fatty Acid Synthesis. *ACS Chemical Biology* **15**, 1826–1834. doi: 10.1021/acscchembio.9b00982.
- Weiser JN, Ferreira DM, Paton JC. 2018. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. *Nature Reviews Microbiology* **16**, 355–367. doi: 10.1038/s41579-018-0001-8.
- Whiley RA, Hardie JM 2009. Genus *Streptococcus*. Pages 655-711 in Whitman WB, editor. *Bergey's Manual of Systematics Bacteriology*; Volume 3: The Firmicutes. Springer, New York.

WHO. 2017. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. World Health Organization, Geneva.

Williams DJ, Cooper WO, Kaltenbach LA, Dudley JA, Kirschke DL, Jones TF, Arbogast PG, Griffin MR, Creech CB. 2011. Comparative effectiveness of antibiotic treatment strategies for pediatric skin and soft-tissue infections. *Pediatrics* (e479–e487). doi: 10.1542/peds.2010-3681.

Yanza YR, Szumacher-Strabel M, Jayanegara A, Kasenta AM, Gao M, Huang H, Patra AK, Warzych E, Cieślak A. 2020. The effects of dietary medium-chain fatty acids on ruminal methanogenesis and fermentation in vitro and in vivo: A meta-analysis. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* (1–16). doi: 10.1111/jpn.13367.

Yoon BK, Jackman JA, Kim MC, Cho NJ. 2015. Spectrum of membrane morphological responses to antibacterial fatty acids and related surfactants. *Langmuir* **31**, 10223–10232. doi: 10.1021/acs.langmuir.5b02088.

Yoon BK, Jackman JA, Kim MC, Sut TN, Cho NJ. 2017. Correlating membrane morphological responses with micellar aggregation behavior of capric acid and monocaprin. *Langmuir* **33**, 2750–2759. doi: 10.1021/acs.langmuir.6b03944.