



Česká buiatrická společnost

Sborník referátů odborného semináře

PARATUBERKULÓZA SKOTU



Kongresové centrum
ALDIS a.s.
Hradec Králové
9. dubna 2011

Obsah:

| | |
|---|-----------|
| Paratuberkulóza u přežvýkavců – epidemiologie, patogeneze, diagnostika a prevence..... | 6 |
| Dr. Johannes Lorenz Khol, PhD., Prof. Dr. Walter Baumgartner, PhD., Dr. hc. Veterinární univerzita Vídeň | |
| Výskyt původce paratuberkulózy v ČR a možnosti ozdravování infikovaných chovů přežvýkavců | 13 |
| Prof. MVDr. Ivo Pavlík, CSc., Mgr. Iva Slaná, PhD., Mgr Petr Králík, PhD., MVDr. Alena Králová. VÚVeL Brno | |
| Paratuberkulóza skotu – koncepčnost a efektivita tlumení | 16 |
| MVDr. Jan Bažant, MVDr. Petr Šatrán, PhD., MVDr. Zdeněk Semerád, SVS ČR Praha | |



ČESKÁ BUIATRICKÁ SPOLEČNOST

Palackého 1-3, 612 42 Brno,

e-mail: cebs@seznam.cz

SBORNÍK REFERÁTŮ ODBORNÉHO SEMINÁŘE
PARATUBERKULÓZA SKOTU

Odborný garant: Doc. MVDr. Josef Illek, DrSc., Dipl. ECBHM

MVDr. Jan Šterc, Ph.D.

Kongresové centrum ALDIS a.s. Hradec Králové

9. 4. 2011

ISBN:

ISBN: 978-80-86542-26-2

PARATUBERKULÓZA U PŘEŽVÝKAVCŮ – EPIDEMIOLOGIE, PATOGENEZE, DIAGNOSTIKA A PREVENCE

Khol, J.L., Baumgartner, W.

Klinika chorob přežvýkavců Ústav pro hospodářská zvířata a veterinární aspekty zdraví veřejnosti
Univerzita veterinární medicíny Vídeň, Rakousko

Shrnutí

Paratuberkulóza je v dnešní době považována za jedno z nejvýznamnějších onemocnění přežvýkavců. Ačkoliv se tato nemoc vyskytuje především u skotu, ovcí a koz, její původce, *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* (MAP), napadá širokou škálu hostitelů. Údaje o prevalenci MAP se různí, v některých regionech je prevalence až 84,7%. I když nejvíce náchylná vůči paratuberkulóze jsou telata, dospělý skot může být také infikován MAP. Většinou k infekci dojde brzy po narození perorálním příjmem patogenů z výkalů, kolostra nebo mléka infikovaných dospělých zvířat. Nákup infikovaných zvířat, která nevykazují klinické známky onemocnění, je hlavní cestou šíření MAP. Prvním klinickým příznakem, který je obvykle pozorován u dospělého skotu, je chronický nebo intermitentní průjem, střídající se s obdobími, kdy mají výkaly normální konzistenci. Subklinicky infikovaná zvířata nevykazují viditelné známky paratuberkulózy, ale mohou vylučovat MAP a stát se zdrojem infekce ve stádě.

Pro detekci MAP nebo specifických protilátek existují různé laboratorní testy. K nejčastěji používaným testům patří barvení Ziehl-Neelsenovo barvení, fekální kultivace a reakce polymerázových řetězců (PCR), a také hodnocení hladin protilátek pomocí Enzyme Linked Immuno Sorbent Assays (ELISA).

Paratuberkulóza je obtížně diagnostikovatelná, neléčitelná choroba, která může způsobovat značné ekonomické ztráty v postižených chovech. Proto je velice důležité potlačovat a omezovat infekce MAP v pozitivních stádech a bránit rozšíření chorob do negativních stád. Hygienická preventivní opatření jsou nezbytná pro zabránění dalšího šíření MAP v pozitivních stádech. Hlavním cílem těchto hygienických opatření je zabránit infekci telat a mladého skotu a nakupovat pouze zvířata prostá MAP.

Tento referát poskytuje stručné shrnutí poznatků o MAP u skotu, včetně diagnostiky a navrhovaných programů tlumení. Naším cílem je sdělit veterinárním lékařům velkých zvířat nové vědecké poznatky o paratuberkulóze spolu se základními informacemi o tomto onemocnění, a tak je podpořit v boji proti této významné chorobě.

Historie a etiologie

Paratuberkulózu poprvé popsali v roce 1895 Johne a Frothingham, kteří také prokázali přítomnost tzv. acid-fast (acidorezistentních) tyčinek v určitých úsecích střeva infikovaných zvířat (Johne a Frothingham, 1985). Tyto tyčinky jsou nerozlišitelné od bakterií způsobujících tuberkulózu, což vedlo k závěru, že jde o atypickou formu tuberkulózy. O více než 10 let později Bang (1906) zjistil, že se nejedná o tuberkulózu a nazval toto onemocnění pseudotuberkulózní enteritida. Později začalo být označováno jako paratuberkulóza nebo Johneova choroba (JD).

Původcem paratuberkulózy je *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP), pomalu rostoucí, acidorezistentní tyčinkovitá bakterie, které je kultivovatelná na živné půdě obsahující mykobaktin (Turenne a David, 2010).

MAP má schopnost přežít po dlouhou dobu mimo hostitele. Rowe a Grant (2006) uvádějí dobu přežití v běžném prostředí 55 týdnů a ve vodních nádržích 120 týdnů. Whittington et al. (2004) zjistili přežívání MAP po 55 týdnů v kejďe skladované ve stínu.

Dobu přežití MAP v prostředí zkracuje vysoká teplota, ultrafialové záření a také nízké pH a vlhkost (Grewal et al., 2006; Sung a Collins, 2003; Whittington et al., 2004).

Hlavní příčinou dlouhého přežívání MAP v prostředí je buněčná stěna s vysokým obsahem lipidů (Rowe a Grant, 2006), a také nedávno popsané pohlcování mykobakterií jinými mikroorganismy a schopnost upadnout do dormance. Interakce MAP a ubikvitními protozoi a mikroby v prostředí a pohlcování těmito mikroorganismy vede k vyšší rezistenci vůči chloru a umožňuje MAP přežít po dlouhou dobu a dokonce se i množit uvnitř hostitelských mikroorganismů (Rowe and Grant, 2006; Whan et al., 2006). Schopnost bakterie upadnout do neaktivní fáze, takzvané dormance, byla také popsána jako jedna z taktik, díky níž MAP přežívá tak dlouho v prostředí (Whittington et al., 2004; Whittington et al., 2005; Rowe and Grant, 2006). Důvody, proč MAP upadá do dormance a vrací se pak opět do vegetativního stádia, nebyly ještě objasněny (Whittington et al., 2004).

Hostitelé

I když je MAP považováno za původce onemocnění u skotu, ovcí a koz, má široké spektrum hostitelů a můžeme je nalézt u mnoha různých druhů divokých i domácích přežvýkavců. Paratuberkulóza byla zjištěna i u jelenů a muflonů (Macháčková et al., 2004), vodních buvolů (Sivakumar, 2005) a velbloudovitých (Selbitz, 2003). Infekce MAP byly popsány také u monogastrických druhů, jako jsou ptáci, divoká prasata (Alvarez et al., 2005), myši, krysy, zajáci a lišky (Flourou et al., 2005), králíci (Judge et al., 2005), medvědi a primáti (Klee, 2004). Na rozdíl od přežvýkavců však monogastrické druhy nevykazují klinické příznaky paratuberkulózy.

Byl také zjištěn zvýšený výskyt MAP a specifických protilátek u lidí trpících Crohnovou chorobou, což vedlo ke stále ještě probíhajícímu diskusím o možné souvislosti mezi těmito dvěma chorobami (Behr, 2010).

Prevalence

Paratuberkulóza se vyskytuje na celém světě, pouze Švédsko a některé australské státy prohlašují, že jsou prostě paratuberkulózy. Ve Švédsku však paratuberkulóza zjištěna byla, i když s velmi nízkou prevalencí (Holmström and Stenlund, 2005).

Hlášená prevalence infikovaných zvířat se v různých zemích liší, dosahuje až 84,7% MAP pozitivních stád v některých částech Německa (Hacker et al., 2004). Van Leeuwen et al. (2001) uvádějí, že v roce 2007 bylo zjištěno 43,0% pozitivních stád mléčného skotu v Kanadě a 68,1% ve Spojených státech amerických (Anonym, 2008).

V Rakousku byly provedeny dvě reprezentativní studie, které ukázaly zvýšení séroprevalence protilátek proti MAP z 6,97% pozitivních stád skotu v letech 1994-97 na 19,05% pozitivních stád v letech 2002-2003 (Baumgartner et al., 2005).

Přehled globálního výskytu paratuberkulózy publikoval Barkema et al. (2010). Další souhrn informací o výskytu paratuberkulózy v Evropě můžeme nalézt v referátu Nielsena a Tofta (2009).

Přenos a patogeneze

Většina skotu je infikována MAP již jako telata, ale díky dlouhé inkubační době a chronickému charakteru může trvat léta, než je paratuberkulóza rozpoznána ve stádu. I když telata jsou nejvíce náchylná, může být infikován i dospělý skot (Whitlock, 1996). Přibližně 25% telat narozených s klinickými příznaky paratuberkulózy bylo infikováno již *in utero*, ale nejvýznamnější cestou infekce je postnatální fekálně-orální přenos. Primárním

místem infekce MAP je ileum. MAP vstupuje do M buněk v Peyerových placích a přenáší se dále do makrofágů (Momontani et al., 1988). Uvnitř makrofágů může MAP migrovat do mezenteriálních mízních uzlin a přes ductus thoracicus do krevního řečiště. Krev pak roznáší infikované makrofágy po celém těle (Chiodini, 1996; Lugton, 1999).

V důsledku dlouhé inkubační doby se první klinické příznaky paratuberkulózy, jako je průjem a ztráta hmotnosti, neobjevují před dovršením druhého roku života. Ve stádech s vysokou prevalencí paratuberkulózy se však mohou objevit už v prvním roce (Fecteau a Whitlock, 2010). Infikovaná zvířata mohou vylučovat velké množství MAP ve výkalech. Takzvaní "super vylučovatelé" mohou vylučovat více než milion kolonie tvořících jednotek (cfu) MAP na gram trusu, aniž by vykazovali klinické příznaky (Whitlock et al., 2005). I když vylučování MAP obvykle nezačíná před rokem a půl věku, ukázalo se, že i mladá telata mohou vylučovat tyto bakterie a tak přenášet infekci na jiná telata v tomtéž prostředí (Bolton et al., 2005; Weber et al., 2005). K infekci MAP dochází obvykle perorální cestou brzy po narození. Nečastějším zdrojem je fekální kontaminace prostředí, v němž žijí telata, a vemene (pokud tele pije od matky). MAP se mohou nalézat také v kolostru a mléce asymptomatických krav, které se tak může stát zdrojem infekce. Bohužel pasterizací kolostra a mléka se riziko infekce sice sníží, ale neodstraní (Whitlock, 1996), protože MAP vytvářejí shluky a dokáží přestát pasterizaci. Mluví se i o možnosti přenosu semenem, embryotransferem a od divoce žijících přežvýkavců (Judge et al., 2005; Khol et al., 2010; Philpott, 1993). Do většiny stád se však MAP dostane koupí asymptomatických infikovaných zvířat.

Klinické projevy

Paratuberkulóza se šíří pomalu a v dobře vedených chovech může být míra infekce nižší než ve špatných chovech. Ztráty ve stádě v důsledku předčasných úhynů mohou být vysoké. Podle Fecteau a Whitlock (2010) mají MAP infekce u skotu čtyři stádia. První stádium se nazývá „tichá infekce“. Zvířata v tomto stádiu se v ničem neliší od neinfikovaných zvířat ve stádě. Mohou vylučovat nízké počty MAP ve výkalech, které mohou tu a tam být detekovány, pokud jsou vzorky odebírány často. ELISA nedokáže detekovat protilátky v tomto stádiu infekce. MAP mohou být detekovány při kultivaci vzorků tkání uhynulých zvířat (Fecteau a Whitlock, 2010). Infikovaná zvířata vstupují do druhého stádia jako "skrytí dospělí

přenašeči”, kdy mají vyšší koncentrace MAP ve střevní tkáni a vylučují vyšší počty MAP ve výkalech. Zvířata v tomto stádiu onemocnění nevykazují klinické příznaky paratuberkulózy, ale obvykle mají jiné zdravotní problémy, jako je neplodnost, mastitis, kulhání a snížená produkce mléka (Merkal et al., 1975). Pro třetí stádium, tzv. „klinické onemocnění”, je typická ztráta hmotnosti a průjmy (Fecteau a Whitlock, 2010). S průjmy souvisí celková vyhublost, hrubá srst, suchá kůže a chronická ztráta hmotnosti navzdory normálnímu nebo dokonce zvýšenému apetitu. Většina zvířat v tomto stádiu onemocnění vylučuje vysoké koncentrace MAP ve výkalech a fekální kultivace a krevní ELISA test u nich vycházejí pozitivně. S pokračujícím onemocněním se zvíře dostává do čtvrtého stádia, „pokročilého klinického onemocnění”. Slábnou, silně hubnou a trpí chronickým profúzním průjmem. Intermandibulární edém (“lahvovitá čelist”) je dalším typickým příznakem konečného stádia paratuberkulózy (Fecteau a Whitlock, 2010).

Progrese onemocnění je rozdílná podle prevalence paratuberkulózy ve stádě (Fecteau a Whitlock, 2010). Tichá fáze obvykle trvá 2 až 10 let, ale infikovaná zvířata mohou postoupit z prvního až do třetího stádia v prvním roce života (Fecteau a Whitlock, 2010). Jakmile začnou být paratuberkulózní zvířata vychrtlá a trpí profúzním průjmem (čtvrté stádium), zhoršuje se jejich stav velmi rychle a k úhynu dochází během několika dnů (Fecteau a Whitlock, 2010).

Ekonomický význam

Paratuberkulóza je považována za jedno z nejrozšířenějších a nejnákladnějších onemocnění mléčného skotu v dnešní době. Také postihuje masný skot, zejména čisto-krevné chovy. Konečnými důsledky paratuberkulózy jsou úhyn nebo vyřazení ze stáda. I při subklinicky probíhající onemocnění však dochází k poklesu užitkovosti, reprodukčním poruchám a zvýšené náchylnosti vůči dalšímu onemocnění. Zvířata, která mají klinické příznaky paratuberkulózy, jsou pouze špičkou ledovce (Fecteau a Whitlock, 2010). Ve stádě připadají na jedno zvíře s pokročilou klinickou paratuberkulózou 1-2 zvířata s klinickým onemocněním, 6 až 8 skrytých přenašečů a 12-25 jedinců s “tichou” infekcí MAP (Fecteau a Whitlock, 2010). Ekonomické ztráty zahrnují sníženou produkci mléka, horší zpeněžení na jatkách, náklady na veterinární ošetření, náklady na programy tlumení chorob a také ztráty způsobené nedostatečným využitím výrobního zařízení. Whitlock (1996) odhaduje, že celkové roční ztráty v sek-

toru chovu mléčného skotu v USA překračují 1,5 miliardy dolarů. V roce 1996 byla uváděna ztráta 200 ± 160 milionů dolarů pro americkou ekonomiku v důsledku snížené produkce mléka na farmách pozitivních na paratuberkulózu (Losinger, 2005).

Diagnostika

Klinické případy paratuberkulózy lze většinou diagnostikovat na základě klinického vyšetření, anamnézy nebo pitevních nálezů. Pokud chybí klinické symptomy, je nutné použít laboratorní testy pro vyloučení nebo potvrzení diagnózy. Bohužel dnes nejsou k dispozici žádné laboratorní testy pro diagnostiku paratuberkulózy s vysokou senzitivitou a specificitou. Diagnostika paratuberkulózy je u subklinicky nemocného skotu problematická (Collinis et al., 1994). Laboratorní testy na MAP infekce lze rozdělit na přímé metody, jako je například vyšetření nátěrů obarvených Ziehl-Neelsenem, fekální kultivace a PCR, a nepřímé metody, které měří imunitní odpověď, jako je Agar Gel Immunodiffusion (AGID), Complement Fixation Test (CFT) a Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

Detekce MAP ve výkalech pomocí Ziehl-Neelsenova barvení představuje levný, rychlý a snadný způsob jak potvrdit diagnózu klinických případů paratuberkulózy (Schliesser a Schaal, 1984). Bohužel, tato metoda má nízkou senzitivitu pro odhalení subklinicky infikovaných zvířat (Merkal, 1993).

Bakteriální kultivace vzorků z výkalů nebo tkání (střevo, střevní nebo jaterní mízní uzliny) je jedním z nejrozšířenějších testů a slouží jako standard pro detekci MAP. Specificita fekální kultivace dosahuje 98% a senzitivita 70% u skotu s klinickou paratuberkulózou. Senzitivita však klesá na 23-49% u subklinicky nemocných jedinců (Nielsen et al., 2001) při použití pevných živných půd. Pokud jsou použity systémy kultivace v tekutém substrátu, může se inkubační doba zkrátit na 23 dnů (Thomas et al., 2005). Pro snížení nákladů na bakteriální kultivaci lze připravit směsný fekální vzorek až od 5 krav. Uvádí se, že kultivace těchto směsných vzorků má specificitu 86% a senzitivitu 96% v porovnání s individuálními vzorky (Kalis et al., 1999).

PCR může být použita jako přímá metoda detekce MAP ve výkalech, tkáních, krvi a mléce a také pro potvrzení výsledků bakteriální kultivace. Specificita PCR se blíží 100%, v závislosti na použité metodě, ale senzitivita je nízká – 53% (Diéguez et al., 2009; Bielsen et al., 2001). Dnes je k dispozici několik různých PCR sad (kitů) k oka-

mžitému použití a mnoho skupin vědců a firem pracuje na zlepšení této metody. Amplifikace inzerční sekvence IS900 se používá jako standardní cíl pro detekci MAP ve většině těchto sad. V porovnání se sekvencí F57, která se také používá a existuje jako jedna kopie uvnitř genomu MAP, se IS900 nachází na úrovni 14 až 18 kopií na genom (Bull et al., 2000; Möbius et al., 2008). Ačkoliv bylo zjištěno, že PCR pro F57 je specifitější, jeho přítomnost v pouze jedné kopii na genom snižuje senzitivitu v porovnání s IS900 (Slana et al., 2008). Velkou výhodou PCR je možnost získat výsledky do 24 hodin. Nevýhodou oproti bakteriální kultivaci ovšem je, že nelze rozlišit mezi živými a neživými buňkami MAP (Nielsen et al., 2001).

Relativně novým přístupem k hodnocení MAP ve stádech je vyšetření fekálních vzorků z prostředí. Cílem tohoto testovacího schématu je detekovat MAP bakteriologickou kultivací nebo PCR ve fekálních vzorcích odebraných z nejfrekventovanějších oblastí ve stáji.

Ukázalo se, že až 90% stád mléčného skotu infikovaných MAP může být detekováno pomocí fekálních vzorků z prostředí (Berghaues et al., 2006; Khol et al., 2009; Lombard et al., 2006). Kromě snadného a rychlého schématu odběru vzorků je další výhodou této metody výrazné snížení nákladů.

Co se týká metod nepřímé detekce, je ELISA pravděpodobně nejrozšířenějším screeningovým testem v dnešní době (Nielsen et al., 2001). Je pravidelně využívána pro detekci specifických protilátek proti MAP ve vzorcích krve, ale lze ji využít i u mléka (Böttcher a Gangl, 2005). Dnes existuje mnoho různých komerčních kitů ELISA. Testy ELISA jsou snadné a rychlé a umožňují určitou automatizaci analýz. Senzitivita a specifita testů ELISA závisí na tom, o kterou testovací sadu se jedná a co je používáno jako standard. V závislosti na těchto proměnných se senzitivita pohybuje od 7 do 94% a specifita od 41 do 100% (Nielsen a Tofr, 2008). Hlavní překážkou pro ELISA testy je pozdní a variabilní látková imunitní odpověď u zvířat infikovaných MAP, která způsobuje opožděné zvýšení hladin protilátek, což vede k falešně negativním výsledkům u mladých nebo nedávno infikovaných zvířat (Klee, 2004). Nicméně ELISA je jednou z nejlevnějších a nejvhodnějších metod pro vyšetření stád v rámci programů tlumení MAP. Pokud se používá pro diagnostiku u jednotlivých zvířat, je nezbytná správná interpretace výsledků a možnost opakování testu v případě potřeby.

Diagnostické nástroje pro detekci paratuberkulózy a MAP učinily obrovský pokrok. I v současné době probíhají intenzivní výzkumy v tomto směru. Diagnostika

je však stále obtížná u mladých zvířat a zvířat v raném stádiu infekce. Volba vhodného diagnostického nástroje, kombinace přímých a nepřímých testů a opakované vyšetření zvířat a stád jsou nejdůležitějšími klíči k úspěchu při diagnostice paratuberkulózy.

Tlumení a prevence

Protože paratuberkulózu je těžké diagnostikovat a nemožné léčit, je velice důležité zavádět kontrolní programy ve stádech pozitivních na MAP a zabránit šíření onemocnění do negativních stád. Bylo navrženo již mnoho různých programů tlumení a eradikace paratuberkulózy, které jsou buď dobrovolné nebo povinné. Ačkoliv mezi těmito programy je mnoho rozdílů v diagnostických postupech, požadavky na úroveň hygienických a chovatelských opatření a kontroly stád jsou víceméně identické.

Ve většině případů je výskyt klinického onemocnění paratuberkulózu podnětem k zavedení programu tlumení nebo eradikace v postiženém stáde. Zvířata, která vylučují MAP, musejí být vyřazena ze stáda co nejdříve za každých okolností, protože představují hlavní riziko šíření nových infekcí ve stáde. Zvířata pozitivní na protilátky by také měla být co nejdříve vyřazena a cele stádo opakovaně testováno kombinací přímých a nepřímých diagnostických testů.

Pro začátek se doporučuje testovat každých šest měsíců testem ELISA a bakteriální kultivací nebo PCR fekálních vzorků všechna zvířata starší než jeden a půl roku. Mohou být použity smíšené fekální vzorky až od pěti krav (Kalis et al., 1999), aby se snížily náklady. Po každém testování by měla být zvířata, která vylučují MAP, okamžitě vyřazena ze stáda ihned, sérologicky pozitivní jedinci co nejdříve. Pro rychlé snížení výskytu infekce by měli být také vyřazeni všichni potomci od pozitivních krav. Jakmile se ve stáde nenacházejí už žádná zvířata vylučující MAP, může se prodloužit interval testování na jedenkrát za rok a střídat ELISA s bakteriální kultivací nebo PCR.

Aby se zabránilo dalšímu šíření nemoci uvnitř stáda, musí být zavedena hygienická preventivní opatření v chovech pozitivních na MAP. Cílem těchto hygienických opatření je prevence nových infekcí u telat a mladého skotu a nákup pouze zvířat prostých MAP. Optimální hygiena při telení, okamžité oddělení novorozených telat od matek a také separace potomků od matek pozitivních na antigeny a protilátky jsou nejdůležitějšími opatřeními pro zabránění infekce novorozených telat. Dále by mělo být zkrmováno mlezivo pouze od krav prostých antigenů a protilátek vůči MAP a pokud je to možné, pro obnovu stáda by mělo být použito potomstvo pouze od negativních krav.

Mladá zvířata musí být oddělena od dospělých na pastvě po první dva roky eradikačního programu. Aby se zabránilo šíření MAP krmivem a vodou, může být chlévskou mrvou a močůvkou hnojena pouze orná půda. Nesmí dojít k fekálnímu znečištění vodních zdrojů. Pro mladá zvířata by se mělo používat také zvláštní nářadí. Zvláštní důraz by měl být kladen na důkladné čištění a dezinfekci.

Samozřejmě "maximální program" proti paratuberkulóze je velmi drahý, vyžaduje velké změny v organizaci chovu a je časově náročný. Tyto nepříznivé skutečnosti často vedou k odmítnutí takového intenzivního programu chovateli a veterináři. Zavedení základního programu boje proti MAP jako alternativy k intenzivním programům tlumení by mělo ukázat, že paratuberkulózu lze omezit v populaci skotu využitím efektivních, jednoduchých a praktických opatření. Tento "minimální program" pro potlačování paratuberkulózy u skotu sestává ze 3 kroků. První krok znamená vyřazení všech zvířat s klinickou paratuberkulózou a diagnostické posouzení každého případu průjmu u dospělého skotu pro vyloučení infekce MAP. Druhým krokem je zavedení základních chovatelských opatření, jak je uvedeno výše, pro prevenci nových infekcí ve stádě. Tato hygienická opatření musí být upravena a uskutečněna podle možností daného chovu (ekonomika, načasování). Poslední krok spočívá v pravidelném hodnocení MAP ve stádě pomocí odběru vzorků z prostředí. Tyto tři kroky lze uskutečnit s rozumnými náklady a pracovní náročností ve většině stád skotu, a v případě potřeby je lze intenzifikovat. I když tento "minimální program tlumení" pravděpodobně nepovede k úplné eradikaci MAP, cílem programu může být snížení počtu krav s klinickou paratuberkulózou, které vylučují MAP do prostředí, zabránění novým infekcím ve stádě a ochrana stád, která jsou prostá onemocněním.

Kromě redukce pronikání MAP do řetězce výroby potravin je dalším pozitivním vedlejším účinkem programů tlumení MAP skutečnost, že obecně zvyšují úroveň hygieny v chovech a pomáhají tak snížit výskyt ostatních onemocnění, zvýšit efektivitu produkce a welfare zvířat.

Závěr

Paratuberkulóza je jedním z nejvýznamnějších onemocnění přežvýkavců v dnešní době. Díky dlouhému inkubačnímu období, vysokým ekonomickým ztrátám, obtížnosti včasné diagnózy a možné souvislosti s Crohnovou chorobou u lidí patří paratuberkulóza k nejdůležitějším onemocněním jak pro veterináře, tak pro cho-

vatele dnes i v budoucnu. Je potřeba se intenzivně snažit získat více znalostí o této chorobě a vyvinout spolehlivé diagnostické nástroje pro mladá zvířata. Nicméně již existují dostatečně spolehlivé metody pro zavedení programů tlumení při rozumných nákladech a pracovní náročnosti ve většině chovů skotu. Tyto kontrolní programy nejenže redukuje paratuberkulózu v postižených chovech, ale také pomáhají snižovat vstup MAP do řetězce výroby potravin pro lidskou spotřebu, zvyšují úroveň hygieny v chovech, omezují ostatní onemocnění a tak zlepšují ekonomiku chovu a welfare zvířat.

Literatura

Álvarez J, de Juan L, Aranaz A, et al. (2005): A survey on paratuberculosis in wildlife in Spain. In: The 8th International Colloquium on Paratuberculosis. Copenhagen, Denmark 2005, p.130.

Anonym (2008): John's disease on U.S. dairies, 1991-2007. United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service info sheet April 2008, Veterinary Services, Centers for Epidemiology and Animal Health. <http://nahms.aphis.usda.gov>

Baumgartner W, Damoser J, Khol JL (2005): Vergleich zweier serologischer Untersuchungen der österreichischen Rinderpopulation zur Verbreitung der bovinen Paratuberkulose (John'sche Krankheit) in den Jahren 1995-97 und 2002/03 und Vorstellung geplanter Bekämpfungsmaßnahmen. Wien. Tierärztl. Mschr. 92, 274-277.

Bang B (1906): Chronische pseudotuberkulöse Darmentzündung beim Rind. Berl. Tierärztl. Wschr. 22, 759-763.

Barkema HW, Hesselink JW, McKenna SLB et al. (2010): Global prevalence and economics of infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Ruminants. In: Behr M.A., Collins D.M., eds. Paratuberculosis Organism, Disease, Control. 1st ed. Wallingford: CAB International, pp.10-21.

Behr MA (2010): Paratuberculosis and Crohn's disease. In: Behr M.A., Collins D.M., eds. Paratuberculosis Organism, Disease, Control. 1st ed. Wallingford: CAB International, pp. 40-49.

Berghaus RD, Farver TB, Anderson RJ et al. (2006): Environmental sampling for detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* on large Californian dairies. J. Dairy Sci. 89, 963-970.

Bolton MW, Grooms DL, Kaneene JB (2005): Faecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in calves: Implication for disease control and manage-

ment. The 8th International Colloquium on Paratuberculosis. Copenhagen, Denmark 2005, p. 128.

Böttcher J, Gangl A (2005): Value of bulk- milk –serology for control of Johne’s disease. In: The 8th International Colloquium on paratuberculosis. Copenhagen, Denmark 2005, p. 99.

Bull T, Hermon-Taylor J, Pavlik, I. et al. (2000): Characterisation of IS900 loci in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and development of multiplex PCR typing. Microbiol. 146, 2185–2197.

Chiodini RJ: 1996, Immunology: Resistance to paratuberculosis. Vet. Clin. N. Am. Fd. Anim. Pract. 12:313-341.

Collins MT, Sockett DC, Goodger WJ. et al. (1994): Herd prevalence and geographic distribution of, and risk factors for bovine paratuberculosis in Wisconsin. JAVMA 204, 636-641.

Diéguez FJ, Gonzalez AM, Menéndez et al. (2009): Evaluation of four commercial serum ELISAs for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in dairy cows. Vet. J. 180, 231-235.

Fecteau ME, Whitlock RH (2010): Paratuberculosis in cattle. In: Paratuberculosis, Organism, Disease, Control, ed. Behr MA, Collins DM, 1st ed., CAB International, pp.144-146.

Florou M, Leontides L, Billinis C, et al. (2005): Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from non -ruminant wildlife in Greece. In: The 8th International Colloquium on Paratuberculosis. Copenhagen, Denmark 2005, p. 134.

Grewal SK, Rajeev R, Sreekumari, et al. (2006): Persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and other zoonotic pathogens during simulated composting, manure packing and liquid storage of dairy manure. Appl. Env. Microbiol. 72, 565-574.

Hacker U, Hüttner K, Konoe M (2004): Untersuchungen zur serologischen Prävalenz und zu Risikofaktoren der Paratuberkulose in Milchviehbetrieben in Mecklenburg-Vorpommern. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 117, 140-144.

Holmström A, Stenlund S. (2005): Control of paratuberculosis in live cattle and semen imported to Sweden 1995-2004. In: The 8th International Colloquium on Paratuberculosis. Copenhagen, Denmark 2005, p. 18.

Johne HJ, Frothingham J (1895): Ein eigentümlicher Fall von Tuberkulose beim Rind. Dtsch. Z. Tiermed. Pathol. 21, 438-454.

Judge J, Kyriazakis I, Greis A, et al. (2005): Clustering of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in rabbits and the environment: how hot is a hot spot? Appl. Environ. Microbiol. 71, 6033-6038.

Kalis CHJ, Hesselink JW, Barkema HW (1999): Comparison of culture of individual and strategically pooled bovine fecal samples for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. In: Manning EJB, Collins MT, eds. Proc 6th International Colloquium on Paratuberculosis. Int. Assoc. for Paratuberculosis Inc., Madison, WI, USA 1999, pp. 344-348.

Khol JL, Kralik P, Slana I et al. (2010): Consecutive Excretion of *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* in Semen of a Breeding Bull Compared to the Distribution in Feces, Tissue and Blood by IS900 and F57 Quantitative Real-Time PCR and Culture Examinations. J. Vet. Med. Sci. 72, 1283–1288.

Khol JL, Vill M, Dünser M et al. (2009): Environmental faecal sampling, a new approach in diagnosis and surveillance of paratuberculosis in Austrian cattle herds. Wien. Tierärztl. Mschr. - Vet. Med. Austria 96, 279-285.

Klee W (2004): Paratuberkulose (Johnesche Krankheit). In: Dirksen HD, Stöber M, eds Innere Medizin und Chirurgie des Rindes, 4th ed., Blackwell, pp. 586-591.

Lombard JE., Wagner BA, Smith RL et al. (2006): Evaluation of environmental sampling and culture to determine *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* distribution and herd infection status on US dairy operations. J. Dairy Sci. 89, 4163-4171.

Losinger WC (2005): Economic impact of reduced milk production associated with Johne’s disease on dairy operations in the USA. J. Dairy Res. 72, 425-432.

Lugton IW (1999): Mucosa-associated lymphoid tissues as sites for uptake, carriage and excretion of tubercle bacilli and other pathogenic mycobacteria. Imm. Cel. Biol. 77, 364-372.

Machackova M, Svastova P, Lamka J, et al. (2004): Paratuberculosis in farmed and free-living wild ruminants in the Czech Republic (1999-2001). Vet. Microbiol. 101, 225-234.

Merkal RS (1993): Laboratory diagnosis of bovine paratuberculosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 163, 1100-1102.

Merkal RS, Larsen AB, Booth GD (1975): Analysis of the effects of inapparent bovine paratuberculosis. Am. J. D. Sci. 87, 3770-3777.

Momontani E, Whipple DL, Thiermann AB, Cheville NF (1988): Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer’s patches in calves. Vet Path 25,131-137.

Möbius P, Hotzel H, Rassbach A. Köhler H (2008): Comparison of 13 single-rounded and nested PCR assays targeting IS900, ISMav2, f57 and locus 255 for detection

of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 126, 324–333.

Nielsen SS, Nielsen KK, Huda A, et al. (2001): Diagnostic Techniques for paratuberculosis. In: Bulletin of the International Dairy Federation 362/2001.

Nielsen SS, Toft N (2008): *Ante mortem* diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon-gamma assay and fecal culture. *Vet. Microbiol.* 129, 217-235.

Nielsen SS, Toft N (2009): A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Prev. Vet. Med.* 88, 1-14.

Philpott M (1993): The Danger of Disease Transmission by Artificial Insemination and Embryo Transfer. *Br. Vet. J.* 149, 339-369.

Rowe MT, Grant IR (2006): *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* and its potential survival tactics. *Letters in Appl. Microbiol.* 42, 305-311.

Schliesser T, Schaal E (1984): Prevalence and diagnosis of paratuberculosis in the Federal Republic of Germany. *Comm. of the Europ. Communities, Report EUR 9000, EN*, 103-114.

Selbitz HJ (2002): Bakterielle Krankheiten der Tiere. In: Rolle M, Mayr A, eds. *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.* 7th ed. Enke Verlag, pp. 562-563.

Sivakumar P, Tripathi BN, Singh N (2005): Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in intestinal and lymph node tissues of water buffaloes (*Bubalis bubalis*) by PCR and bacterial culture. *Vet. Microbiol.* 08, 263-270.

Slana I, Kralik P, Kralova A, Pavlik, I (2008): On-farm spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk studied by IS900 and F57 competitive real time quantitative PCR and culture examination. *Int. J. Food Microbiol.* 128, 250–257.

Sung N, Collins MT (2003): Variation in Resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* to Acid Environments as a Function of Culture Medium. *App. Env. Microbiol.* 69, 6833-6840.

Thomas G, Manning EJB, Collins MT (2005): Comparison of BACTEC and MGIT systems for detection of *M. paratuberculosis*. In: The 8th International Colloquium on Paratuberculosis. Copenhagen, Denmark 2005, p. 122.

Turenne CY, Alexander DC (2010): *Mycobacterium avium* Complex. In: Behr M.A., Collins D.M., eds. *Paratuberculosis Organism, Disease, Control.* 1st ed. Wallingford: CAB International, pp. 60-72.

Van Leeuwen JA, Keefe GP, Tremblay R. et al. (2001): Seroprevalence of infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, bovine leukemia virus and bovine viral diarrhoea virus in Maritime Canada dairy cattle. *Can. Vet. J.* 42, 193-198.

Whan L, Grant IR, Rowe MT (2006): Interaction between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and environmental protozoa. *BMC Microbiology* 6, 63-68.

Weber MF, Kogut K, de Bree J, et al. (2005): Evidence for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* shedding in young stock. In: The 8th International Colloquium on Paratuberculosis. Copenhagen, Denmark 2005, p. 126.

Whitlock R (1996): Johne's disease. In: Smith BS, ed. *Large Animal Internal Medicine.* 2nd ed. Mosby, pp. 899-904.

Whitlock RH, Sweeney RW, Fyock TL, et al. (2005): MAP Super shedders: Another factor in the control of Johne's disease. In: The 8th International Colloquium on Paratuberculosis. Copenhagen, Denmark 2005, p. 42.

Whittington RJ, Marsh IB, Reddacliff LA (2005): Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Dam Water Sediment. *Appl. Env. Microbiol.* 71, 5304-5308.

Whittington RJ, Marshall DJ, Nicholls PJ et al. (2004): Survival and Dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the Environment. *Appl. Env. Microbiol.* 70, 2989-3004.

VÝSKYT PŮVODCE PARATUBERKULÓZY V ČR A MOŽNOSTI OZDRAVOVÁNÍ INFIKOVANÝCH CHOVŮ PŘEŽVÝKAVCŮ

Prof. MVDr. Ivo Pavlík, CSc., Mgr. Iva Slaná, PhD., Mgr. Petr Králík, PhD., MVDr. Alena Králová
*Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., 621 00 Brno, Hudcova 70, e-mail: pavlik@vri.cz

Paratuberkulóza je chronické zánětlivé onemocnění střeva, jehož původcem je intracelulární patogen *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Paratuberkulóza se projevuje snížením dojivosti, průjmy a hubnutím často končícím nutnou porážkou, utracením nebo úhynem. Primárním hostitelem MAP jsou především domácí přežvýkavci (skot, ovce a kozy) a divocí přežvýkavci (jelenovití a mufloni). U lidí je MAP často dáváno do souvislosti se vznikem tzv. Crohnovy choroby podobné v mnoha ohledech s paratuberkulózou. Diagnostiku paratuberkulózy je možné rozdělit na přímou a nepřímou.

Nepřímá diagnostika

Nepřímá diagnostika zahrnuje metody, které neprokazují přímo přítomnost MAP v organismu, ale pouze sledují jeho odpověď na infekci jak prostřednictvím zvýšené hladiny protilátek, tak prostřednictvím zvýšené aktivity buněčné imunity (tuberkulinace Johninem-paratuberkulinem, nebo vyšetření testem pro detekci gama interferonu). Nejrozšířenějším přístupem je detekce protilátek jak v séru, tak v mléce, pomocí testu ELISA. Nevýhodou této metody sledující humorální imunitní odpověď je skutečnost, že MAP je intracelulárním patogenem, se kterým primárně reaguje buněčná složka imunitní odpovědi. ELISA vyšetření je schopné odhalit pouze jedince, u nichž je infekce MAP značně rozvinuta (tedy zvířata starší 18 měsíců), a zvířata jsou často již v klinické fázi onemocnění. U této skupiny zvířat je citlivost vyšetření až 95 %. U zvířat klinicky zdravých, vylučujících pouze MAP v malém množství v trusu či mléce je citlivost vyšetření jen mezi 10 až 15 %. S ohledem na vysokou příbuznost povrchových antigenů mezi jednotlivými druhy mykobakterií je možné se často setkávat s nespecifickými reakcemi. Tyto nepřesnosti v diagnostice vedou k neúměrnému prodlužování ozdravování infikovaných chovů založené pouze na metodě ELISA.

Výhodou testu ELISA je nízká cena a rychlost vyšetření, které umožňují v první fázi realizovat relativně levný monitoring ve stádě. Při analýze séra je nutné odebrat plnou krev, což je invazivní zákrok vyžadující odborné provedení. Testy pro sledování hladiny gama interferonu jsou zatím velmi nákladné a zatím včas neodhalí mladá infikovaná zvířata před tím, než jsou zařazena do dalšího chovu.

Obecnou nevýhodou testů nepřímé diagnostiky je často potřeba následné detekce vlastního původce, tedy MAP.

Přímá diagnostika

Zlatým standardem v přímé diagnostice paratuberkulózy je zatím individuální kultivace trusu nebo tkání při došetřování patologických nálezů z jatek. Zásadním nedostatkem kultivace je fakt, že MAP v kultuře roste minimálně 8 týdnů, přičemž standardní doba kultivace je až 12 týdnů u kmenů od skotu a až 9 měsíců u kmenů od ovcí a muflonů (včetně člověka). Pochopitelně jsou v trusu, či jiných matricích přítomny i jiné mikroorganismy, kterým je nutné dekontaminací zabránit kontaminovat média pro izolaci MAP. Ačkoli je MAP k této dekontaminaci relativně odolné, přece jen dochází k jeho poškození. Dnes víme, že musí být ve vyšetřovaném vzorku minimálně 1000 až 10000 buněk MAP pro jeho úspěšnou kultivaci.

Molekulárně biologických metod bylo zpočátku používáno především pro identifikaci izolátů MAP, při které bylo zjištěno, že tzv. inzerční sekvence IS900 je specifická právě jen pro tohoto původce. Tento fakt vedl k relativně rychlému rozvoji diagnostických postupů založených na jeho detekci nejprve počátkem 90. let metodou hybridizace s citlivostí stejnou jako kultivace. Následně byla i v ČR ověřována metoda PCR (polymerázová řetězová reakce) schopná detekovat 100 až 1000 buněk MAP. Až v roce 2007 byla patentována metoda kvantitativní real time PCR (tzv. qPCR) schopná detekovat 1 až 10 buněk MAP v trusu, v mléce, krvi, ejakulátu, výplachu pohlavního aparátu samic, folikulární tekutině, v pavučinách, sedimentech napájecích vod, v kejďě, hnoji, fermentátech, digestátech a separátech z biostanic, půdě, pletivu rostlin a v dalších vzorcích. Všechny tyto postupy byly v posledních letech na našem pracovišti vyvinuty a ověřeny při tlumení paratuberkulózy skotu, jelenů a muflonů.

Hlavní nevýhodou qPCR je relativně vysoká cena v porovnání s již tak nákladnou kultivací. Časté kritice je také podrobována skutečnost, že obecně metody PCR odhalí nejenom živé, ale i mrtvé buňky MAP. Podle našich více než tříletých zkušeností víme, že i přítomnost „stopového“ množství MAP ve vzorku je nutné brát v úvahu při posuzování účinnosti protinákazových opatření.

Výskyt původce paratuberkulózy v ČR

Do roku 1990 byla paratuberkulóza téměř neznámým onemocněním a pouze v některých chovech skotu a ovcí byla známa. Po importech skotu především z tehdejších států EU v polovině 90. let se nákazová situace výrazně změnila. Tehdy platná Směrnice SVS ČR č. 2/1991 „Paratuberkulóza skotu“ (platná od 31.12.1991) byla v roce 1995 doplněna o podmínky pro zvýšený dvouletý dozor v importovaných stádech sérologickými metodami. V té době byla používána metoda RVK (reakce vazby komplementu) s velmi nízkou citlivostí a specifitou. Stále častěji se objevující podezřelé klinické případy úporného průjmu a hubnutí vedly k odhalení desítek infikovaných stád skotu.

Tlumení paratuberkulózy v letech 1992 až 1997

S ohledem na tehdejší zkušenosti s dlouhodobým ozdravováním paratuberkulózy v několika stádech skotu s mléčnou a masnou užitkovostí pomocí sérologických metod a kultivace (v letech 1992 až 1997 bylo provedeno v SVÚ Praha a VÚVeL Brno celkem více než 65 000 sérologických vyšetření a 33 861 kultivací trusů) se začalo podle tehdy nově platného Metodického návodu č. 5/1997 „Paratuberkulóza skotu (platný od 17.11.1997) ozdravovat pomocí plošné kultivace trusu zvířat starších 18 měsíců.

Tlumení paratuberkulózy v letech 1998 až 2001

V letech 1998 až 2001 bylo kultivací trusů v SVÚ Praha a VÚVeL Brno vyšetřeno 50 073 vzorků trusů. Takto získané zkušenosti ukazovaly, že infikované chovy je možné ozdravit pouze v případě, kdy chovatel dodržoval Metodický návod č. 5/1997. Největším problémem bylo striktní dodržování separovaného odchovu telat určených k dalšímu chovu a vyřazování potomků infikovaných matek, kteří jsou s více než 80% pravděpodobností infikováni *MAP*.

Proto byl 20.7.2001 Metodický návod upraven pod č. 6/2001 a byla vypracována pro SVS ČR stanoviska „Zásady prevence paratuberkulózy na inseminačních stanicích býků v České republice“ (31.8.2001) a „Zásady pro získávání embryí od matek pocházejících z chovů infikovaných paratuberkulózą (Uvedeno v platnost SVS ČR Praha dne 13.11.2001 pod č.j.: VET/374/01). V té době byla ozdravena podle tehdy platného metodického návodu (tedy dvě negativní plošná kultivační vyšetření trusu provedená v rozmezí 6 až 8 měsíců u zvířat starších 18 měsíců) ve 30 % tehdy vyšetřovaných stád.

Tlumení paratuberkulózy v letech 2002 až 2008

V následujícím období let 2002 až 2006 bylo v SVÚ Praha, SVÚ Olomouc a VÚVeL Brno vyšetřeno celkem 84 539 vzorků trusů. Stále častěji se však při ozdravování v infikovaných chovech projevovala naprostá demotivace chovatelů skotu. Ta byla způsobena zejména omezením možností přesunů zvířat a prodeje telat a vykrmených býků do zahraničí a na celkovou tehdejší ekonomickou situaci v ČR. Proto byl Metodický návod 6/2001 upraven dne 11.7.2007 pod č.j. 2007/476/VET ve vztahu k „Podmínkám chovu mláďat určených k výkrmu“.

Z důvodů dokončení ozdravování v některých chovech eliminační i radikální metodou a neochota chovatelů zahajovat ozdravování v nově vyhlášených ohniscích jak skotu, tak ostatních přežvýkavců byl v následujícím období dvou let (2007 až 2008) snížen počet vyšetřovaných vzorků trusů v SVÚ Praha a VÚVeL Brno na 25 763. Dne 4.3.2008 byl vydán zatím poslední Metodický návod SVS ČR č. 5/2008, který zcela změnil pohled na postup při tlumení paratuberkulózy především u dojeného skotu, který je pouze založen na sérologickém vyšetřování metodou ELISA.

Nový přístup při tlumení paratuberkulózy

Od roku 1990 byla paratuberkulóza radikální metodou tlumena jak u mléčného, tak masného a dojeného skotu, u jelenů lesních, daňků, muflonů, antilop a dalších druhů přežvýkavců. Analýzou příčin většího rozšíření *MAP* v postižených chovech přežvýkavců nad možnost jeho tlumení eliminační metodou bylo zjištěno, že v případě pozdní diagnostiky a neznalostí principů šíření *MAP*, docházelo k chybné zootechnické práci z pohledu prevence šíření *MAP*. Při laboratorní diagnostice infikovaných zvířat byla největším problémem délka kultivačního vyšetření trusu trvajícím často 2 až 3 měsíce (v případech opakované kontaminace vzorků trusů od zvířat krmených nekvalitní siláží trvalo vyšetření až 4 měsíce).

Proto byl výzkum ve Výzkumném ústavu veterinárního lékařství zaměřen od roku 2005 na vývoj metod přímé detekci *MAP* pomocí qPCR v různých matricích. Při praktickém využívání této metody při ozdravování vybraných chovů skotu a dalších druhů přežvýkavců bylo v letech 2007 až 2010 provedeno celkem 7 852 analýz. Výhodou tohoto dnes našeho hlavního nástroje (qPCR) pro diagnostiku *MAP* je jeho vysoká specifita a citlivost ve spojení s rychlostí vyšetření (trvání několika dnů při vyšetření několika set vzorků trusů plošného odběru). Nevýhodou z pohledu chovatelského jsou především vyšší finanční náklady, které bez jejich kompenzace státem, brání širšímu zavedení této metody do běžné praxe.

Závěry

Hlavními poznatky tohoto intenzivního výzkumu je podstatné urychlení ozdravování infikovaných stád skotu a ostatních přežvýkavců. Toto ovšem platí v případech spolupráce chovatele a důsledného dodržování navržených protinákazových opatření. Rovněž je možné v dojených stádech analýzou mléčných filtrů (textilní i kovové) pomocí metody qPCR odhalit přítomnost *MAP*. Tento postup s poměrně vysokou citlivostí umožňuje identifikovat infikovaná stáda pouze s několika jedinci vylučujícími *MAP* v mléce. Při došetřování jednotlivých infikovaných zvířat by mohlo být alternativou k plošnému kultivačnímu vyšetření vzorků trusů jejich vyšetřování metodou qPCR. Tímto postupem je možné okamžitě vyřadit masivně vylučující zvířata *MAP* v trusu, která jsou hlavním rizikem pro infekci ostatních zvířat a kontaminaci prostředí.

Poděkování: Práce byla podpořena granty Ministerstva zemědělství ČR (č. MZE0002716202 a QH81065 Národní agentury pro zemědělský výzkum) a grantem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (AdmireVet č. CZ1.05/2.1.00/01.0006-ED0006/01/01). Autoři děkují za poskytnutí a zpracování podkladů MVDr. Petrovi Křížovi z VÚVeL, MVDr. Iloně Parmové z SVÚ Praha a MVDr. Ivo Trčkovi, PhD. z SVÚ Olomouc.

Dostupná literatura

Ayele, W. Y., Machackova, M., Pavlik, I.: The transmission and impact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants. *Veterinarni Medicina*, 2001, 46 (7-8), 205-224. <http://www.vri.cz/docs/vetmed/46-8-205.pdf>

Fixa, B., Pavlík, I., Bedrna, J., Komárková, O., Nožička, Z., Slaná, I., Králík, P., Vaňásek, T., Volfová, M.: *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, etiologický

faktor u Crohnovy choroby? *Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie*, 64 (2), 2010, 7-13.

Hasonova, L., Pavlik, I.: Economic impact of paratuberculosis in dairy cattle herds: a review. *Veterinarni Medicina*, 2006, 51 (5), 193-211. <http://www.vri.cz/docs/vetmed/51-5-193.pdf>

Hasoňová, L., Trčka, I., Pavlík, I.: Paratuberkulóza mléčného skotu. *Náš chov*, 2006, (6), 35-39.

Hasoňová, L., Kříž, P., Pavlík, I.: Původce paratuberkulózy – vlastnosti komplikující ozdravování chovů. *Náš chov*, 2008, 7, 22-25.

Lamka, J., Kopečná, M., Trčka, I., Pavlík, I.: Je podceňování paratuberkulózy u přežvýkavců prozíravé? *Svět Myslivosti*, 2005, 6 (1), 7-11.

Macháčková, M., Lamka, J., Pavlík, I.: Mykobakteriální onemocnění spárkaté zvěře. Paratuberkulóza a její výskyt. *Svět myslivosti*, 2001, 2 (9), 6-8.

Pavlík, I., Pavlas, M., Bejčková, L.: Výskyt, ekonomický význam a diagnostika paratuberkulózy. *Veterinarni Medicina*, 1994, 39 (8), 451-496.

Pavlík, I., Bažant, J., Vitásek, J., Macháčková, M., Mátlová, L., Rozsypalová, Z., Parmová, I.: Paratuberkulóza skotu dovezeného do České republiky. *Veterinářství*, 2001, 51 (4), 159-163.

Pavlík, I.: Ozdravování od paratuberkulózy v ČR. *Náš chov*, 2002, 62 (1), 10-15.

Pavlík, I., Bartoš, M., Roubal, P.: Paratuberkulóza ovcí a koz, současná hrozba. *Náš chov*, 2003, 63 (8), 14-17.

Slana, I., Paolicchi, F., Janstova, B., Navratilova, P., Pavlik, I.: Detection methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and milk products: a review. *Veterinarni Medicina*, 2008, 53 (6), 283-306. <http://www.vri.cz/docs/vetmed/53-6-283.pdf>

PARATUBERKULÓZA SKOTU – KONCEPČNOST A EFEKTIVITA TLUMENÍ

MVDr. Jan Bažant, MVDr. Petr Šatrán, Ph.D., MVDr. Zbyněk Semerád
Státní veterinární správa ČR, Praha

Po úspěšném ozdravení skotu od bovinní tuberkulózy v roce 1968, se pozornost obrátila na další druhy patogenních mykobakterií nepříznivě ovlivňujících zdravotní stav zvířat, případně i lidí. Aviární tuberkulózu u drůbeže se podařilo turnusovým způsobem chovu drůbeže ve velkochovech prakticky vymýtit. To mělo příznivý dopad i na prevalenci a incidenci aviární tuberkulózy u prasat.

Podívejme se však na postupy ozdravování od nálezů, které probíhaly a byly úspěšně zakončeny v minulosti, zejména z pohledu jsme-li schopni vytvořit stejné podmínky. Ze zkušeností víme, že má-li být program úspěšný musí být uplatněn buď na celém území státu nebo minimálně ve vymezeném regionu a musí být povinný. To znamená, musí se mu podřídit všichni chovatelé, kterých se ozdravování týká. Není známý jediný případ při zavedení dobrovolných programů v minulosti, že by vedl ke splnění zadaného cíle. Vezměme si příklad z ozdravování zmíněné bovinní tuberkulózy před půlstoletím. Po komplexní odborné přípravě, promyšleném organizacím, technickém a ekonomickém zázemí bylo přistoupeno k prvnímu kroku. Tím bylo vydání vládního nařízení o zavedení povinného ozdravování na celém území státu s vymezením povinností a pravomocí jednotlivých organizací, zdaleka nikoliv jen orgánů tehdejší veterinární služby. Druhým krokem byl přísun balíku peněz ze státní pokladny na tuto celospolečensky významnou akci a třetím krokem bylo zavedení důsledného (až militantního) dozorového režimu, opěr nikoliv jen orgánů veterinární služby. A výsledek? Dílo se cca za 10 let podařilo dovést do úspěšného konce. Ano připustíme, že tuberkulóza skotu je významnou zoonózou, tedy šlo v první řadě o zdraví lidí, ale zároveň se zamysleme, které z uvedených kroků je reálné aplikovat dnes. Tím chci říci ANO, ozdravovat od dalších a dalších nálezů je nutnost, ale efektivně s výsledkem pro celé odvětví daného druhu zvířat a nikoliv jen s nejistým výsledkem pro jediného chovatele, který si to může dovolit třeba jen proto, že má na ozdravování momentálně peníze. Efektivní ozdravování musí mít pevné zázemí vycházející ze spolehlivé diagnostiky, předem stanoveného organizačního a předem důkladně promyšleného finančního krytí. Případy, kdy muselo být ozdravování z důvodu nedostatku peněz v půli cesty pře-

rušeno, nejsou ojedinělé. Bohužel to znamená, že předtím vynaložené prostředky jsou znehodnoceny.

Na paratuberkulózu je nutno se dívat jako na produkční a ekonomickou nákazu, která může jednotlivému chovateli způsobit značnou chovatelskou i ekonomickou újmu. V České republice je často na paratuberkulózu pohlíženo jako na nákazu výhradně importovanou četnými dovozy chovného skotu zejména březích jalovic v letech 1992- 1996. Tyto dovozy byly z chovatelského hlediska cílené, neboť zde nebyla dostatečná základna zejména holštýnského plemene. Proto je stát finančně podpořil. Je skutečností, že importy chovného skotu nákazovou situací zhoršily, dodnes je nejvyšší prevalence mykobakteriálních enteritid právě u holštýnského plemene. Výskyt nákazy však nelze spojovat jen s uvedenými dovozy skotu, neboť nákaza se na našem území vyskytovala již v první polovině minulého století.

Možno říci, že v současné době je nálezový problém jménem paratuberkulóza řešen v chovatelsky vyspělých zemích ne zcela komplexně a vychází z ojedinělých iniciativ různých chovatelských sdružení a svazů. Jednotlivý chovatel se zajímá o tlumení nákazy až v případě, kdy mu nákaza významně zhoršuje ekonomiku chovu. Existuje řada důvodů proč v současné době ani chovatelsky nejvyspělejší státy nezavedly povinné cílené programy, které by vedly k efektivnímu tlumení nákazy. Jsou to především omezené možnosti intravitální diagnostiky. Obtížné je možné rozlišit epizootologicky závažné druhy mykobakterií vyvolávající progresivní zánětlivé změny sliznice střevní od variant méně virulentních. Po zkušenostech s dosavadním využitím různých sérologických metod lze konstatovat, že spolehlivost těchto dosud pro orientační screening nejvíce používaných metod je nižší, než byla tuberkulinační zkouška při ozdravování od bovinní tuberkulózy. Bakteriologická diagnostika pomocí kultivace původce na speciálních médiích neumožňuje v časově přijatelném termínu určit skot vylučující mykobakterie do vnějšího prostředí. Kromě toho není v možnostech bakteriologické diagnostiky ze vzorků trusu, případně jiných rizikových sekretů zachytit všechna riziková zvířata ve stádě, neboť vylučování mykobakterií není permanentní, ale intervalové. Při diagnostice paratuberkulózy

je nutno postupovat kombinací metod, včetně využití metod molekulární biologie. Významným negativem současné diagnostiky kromě nečasnosti výsledků, je i její cena, která ovlivní každého chovatele při úvaze nákazu v hospodářství řešit či nikoliv. Nedořešenost efektivních diagnostických postupů je také důvodem proč např. Evropská Komise ani mezinárodní úřad pro nákazy O.I.E. nevydaly dosud odborné pokyny k řešení této nákazy jakožto nákazově závažného problému. Paratuberkulóza nebyla dosud zařazena do příloh E (I) ani E(II) směrnice Rady 64/432/ES, což znamená, že se zatím nepočítá s tím, že by evropská Komise schvalovala členským státům ozdravovací programy na tuto nákazu ani vyhlášovala regiony či celá území členských států jako prosté nákazy. Stejně tak není v současnosti uvažováno o vyhlášení paratuberkulózy jako nákazy prioritní, na kterou by bylo možné v čerpat finanční prostředky z fondů ES.

V České republice se problematikou tlumení paratuberkulózy dlouhodobě zabývá Výzkumný ústav veterinárního lékařství v Brně. Jeho názor na tlumení nákazy se promítl zejména v Metodickém návodu SVS ČR č. 6/2001. V ČR se začal výskyt paratuberkulózy intenzivněji sledovat po roce 1995, právě v souvislosti se zmíněnými importy skotu a výskytem klinických příznaků nákazy v některých stádech. V importovaných stádech byl dva roky po importu prováděn tzv. zvýšený epizootologický dozor, v rámci něhož se prováděla i frekventnější vyšetření na důležité nákazy skotu, včetně paratuberkulózy. Některé nálezy původce paratuberkulózy byly také v souvislosti s přesuny skotu, při nichž se běžně provádělo sérologické vyšetření na přítomnost původce paratuberkulózy. Pozitivní sérologické nálezy se dále ověřovaly bakteriologickým vyšetřením z trusu, případně z orgánů při pozitivním pato-anatomickém nálezu. V roce 1999 až 2001 bylo v ČR hlášeno více než 80 případů paratuberkulózy skotu. Jednalo se o stáda s bakteriologicky potvrzeným původcem. Klinické příznaky byly maximálně v polovině těchto stád. Slučováním nebo i zánikem některých stád došlo k poklesu stád s prokázaným původcem na 57 v roce 2006. Nutno přiznat, že cca v 10 stádech došlo postupem podle uvedeného metodického návodu k ozdravení, tzn. dvě sérologická a dvě bakteriologická vyšetření v průběhu 12 měsíců měla negativní výsledek. Na základě toho, což byla i zásada metodického návodu byla stáda prohlášena za prostá paratuberkulózy. Zásady metodického návodu byly přísné, často kritizované zejména představiteli chovatelů- chovatelskými svazy. Nutno říci, že ozdravení jednotlivého stáda v případě, že nebylo sil-

ně zamořené a nákaza se nevyskytovala v klinické formě bylo možné stanoveným postupem docílit v období 5-6 let. Jenže ozdravování těchto jednotlivých případů nemělo z hlediska chovu skotu v ČR jako celku valného významu a navíc chovatelé, jimž se podařilo dojít do úspěšného závěru, se najednou octli jako kapka v moři neznámé nákazové situace. V této situaci, došlo vlastně k obchodní diskriminaci nákazově lepších stád. Dalším významným nedostatkem sporadického individuálního ozdravování stád bylo nedodržování ozdravovacích plánů chovatelů, především opožděné vyřazování zvířat s bakteriologicky prokázaným původcem onemocnění. Dokonce existovaly případy, že předseda družstva se stádem cca 1000 ks. skotu zakázal vyřadit zvířata s prokázaným původcem v trusu se zdůvodněním, že přece krávy, které dojí 9.500 kg mléka za laktaci, nevyřadí, resp., že si to nemůže z ekonomických důvodů dovolit. Výsledkem „ozdravování“ bylo, že na počátku procesu bylo ve stádě 22 bakteriologicky pozitivních krav a po 8 letech ozdravování 64. K čemu takového „ozdravování“? Striktní zásady postupu dané zmíněným metodickým návodem vedly k tomu, že žádný chovatel dobrovolně nepřistoupil na sérologické a případně navazující bakteriologické vyšetření stáda z přirozené obavy, že když se hledá, tak se najde, načež pak následují omezující protinákazová opatření.

Státní veterinární správa provedla v roce 2007 orientační monitoring s cílem upřesnit jaké je cca procento hospodářství s chovem skotu v ČR v nichž se pravděpodobně vyskytuje infekce původcem paratuberkulózy. Monitoring se prováděl zjišťováním protilátek ve vzorcích mléka. Do sledování byla vybrána jen stáda skotu, v nichž bylo chováno více než 300 ks skotu. Monitoring byl pro chovatele anonymní, v případě pozitivních výsledků, nebyla přijímána opatření. Vyhodnocením monitoringu bylo zjištěno, že v ČR je cca 60 % hospodářství s chovem skotu, ve kterých se vyskytuje původce nákazy. Tento náleze se neliší od údajů uváděných třeba SRN, Holandskem, Belgií i Dánskem. Skandinávské státy udávají prevalenci nižší. V ČR je hodně drobných chovatelů skotu. Dá se předpokládat, že u těchto chovatelů s individuální péčí o zvířata bude pravděpodobně nákazová situace lepší. Doplňujícími šetřeními inspektorů KVS bylo zjištěno, že klinicky se paratuberkulóza vyskytovala v méně než 0,5% do monitoringu zařazených hospodářství.

Na základě stížností chovatelů, zejména jejich představitelů chovatelských svazů na postupy stanovené MN č. 6/2001, s tím že diskriminují chovatele, v jejichž stádě byl prokázán původce paratuberkulózy bylo rozhodnuto

o zrušení tohoto MN. S přihlédnutím k předpokládané nákazové situaci, počtu případů klinické formy nákazy v ČR, možnostem diagnostiky, možnostem chovatelů (zejména finančním) sami si hradit ozdravování vydala SVS ČR nový metodický návod, který vznikl po konzultaci s představiteli chovatelů a v mnohém se oproti předchozímu liší. Nový metodický návod č. 5/2008 není návodem na ozdravování od paratuberkulózy, ani návodem na její tlumení. V názvu má uvedeno, že se jedná o postup v prevenci šíření paratuberkulózy skotu v ČR. Tento metodický návod je kompromisem možností co lze v současnosti u této nákazy dělat, jak bránit šíření nákazy a chovatele omezit v produkci jen v nejnútnejším případě, kdy se vyskytuje ve stádě klinická forma onemocnění. Nikdy nebylo řečeno, že tento návod je vodítkem k ozdravení od nákazy.

Metodický návod č. 5/2008 respektuje, že paratuberkulóza je v ČR zařazena do přílohy č. 2 veterinárního zákona, tzn. je považována za nebezpečnou nákazu. To znamená, že chovatel, případně soukromý veterinární lékař je povinen, hlásit podezření na nákazu Krajské veterinární správě. Ve stádě, ve kterém se zjistí klinická forma onemocnění lze předpokládat, že velká část zvířat přišla do styku, případně se nakazila *M. avium paratuberculosis* – původcem paratuberkulózy. Podezření na nákazu hlásí i veterinární hygienický dozor na jatkách pokud zjistí patologicko-anatomické změny na orgánech svědčící pro paratuberkulózu. Obdobnou povinnost hlásit podezření mají i kafilerie při výskytu podezřelých změn u uhynulých zvířat. Podezřením na nákazu je i průkaz protilátek při sérologickém vyšetření krevních vzorků nebo vzorků mléka. Chovatelé přislíbili, že budou organizovat cílené sérologické vyšetřování v hospodářstvích s chovem skotu podle chovatelské významnosti stád. To znamená, začínat by se mělo u stád s nejvyšší užitkovostí, která obchodují s chovným nebo plemenným skotem. Seznam vyšetřených stád bude mít k dispozici místně příslušná KVS. V případě, že nebyl prokázán sérologicky pozitivní skot, KVS vydává chovateli pouze doporučení jak dále pokračovat v ochraně stáda před zavlečením původce a jak stádo klinicky i diagnosticky sledovat. Chovatel není omezen v přemísťování zvířat. V případě pozitivního průkazu protilátek navštíví inspektor KVS dané hospodářství a posoudí, zda-li se nákaza vyskytuje ve stádě

v klinické formě. V případě, že jsou ve stádě klinicky nemocná zvířata, případně podle hlášení z jatek či kafilerie byly nalezeny na orgánech změny svědčící pro paratuberkulózu, stanoví KVS pro dané hospodářství mimořádná veterinární opatření. Tato opatření vycházejí z toho, že ve stádě je rozšířena infekce, proto jsou zaměřena tak, aby se dále nešířila.

Paratuberkulózu skotu je nutno z mnoha důvodů považovat za nákazu, jejíž odrazení je složité, dlouhodobé a finančně náročné. Dosavadní postupy je potřebné chápat jako přechodné, které spíše měly charakter omezit šíření původce. Je známo jak se nákaza šíří, že nejnámavější jsou telata do 3, resp. šesti měsíců stáří. Určitým nedostatkem je, že dosud z hlediska patogenyze nákazy nebyl dostatečně objasněn a chybí tudíž ucelený názor na význam výživy a pohody zvířat při ochraně před infekcemi způsobujícími mykobakteriální enteritidy. V literatuře se vyskytují rozporné informace o tom, v jakém stáří infikované zvíře vylučuje původce do prostředí. Obecně se uvádí, že k vylučování dochází nejčastěji až ve věku 18 měsíců a později. Existují však také názory, že k vylučování mykobakterií může docházet i mladými telaty, která se nakazila bezprostředně po narození. Má-li být ozdravování úspěšné je bezpodmínečně nutné zdokonalit diagnostiku nebo koordinovat diagnostické postupy tak, aby se zpřesnilo, ale zejména urychlilo vyhledání rizikových zvířat ve stádě.

Česká republika má zkušenosti s ozdravováním od nákaz. Efekt může přinést jen proces cílené eliminace původce nákazy ze stád skotu tak, aby prospěch mělo odvětví chovu skotu jako celek. U skupiny produkčních nákaz, mezi které paratuberkulóza patří je nutné, postupovat s respektováním hloubky nákazové závažnosti, možností diagnostiky, možností eliminace rizikových zvířat, možností prosté či zvýšené obměny stád a v každém případě možností finančního zabezpečení. Efektivní boj s nákazou znamená dobře zvážit, je-li situace dobře zmapována, byl-li zvolen správný postup ozdravování, je-li reálné po stránce organizační, zootechnické, metodické a finanční dovést proces do úspěšného konce. Nelze tedy bezhlavě přejímat programy ze zahraničí byť úspěšně realizované, např. certifikační programy z USA, pro jejichž realizaci u nás nejsou resp. dosud nejsou podmínky.

