PARATUBERKULÓZA V CHOVECH DOJENÉHO SKOTU

MVDr. Věra Fichtelová, Ph.D.
MVDr. Kamil Kovarčík, Ph.D.

2021

Publikace vychází za podpory Ministerstva zemědělství ČR při České technologické platformě pro zemědělství

Česká technologická platforma pro zemědělství

MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ

Zemědělský svaz České republiky

VÚVeL Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.

PARATUBERKULÓZA V CHOVECH DOJENÉHO SKOTU

MVDr. Věra Fichtelová, Ph.D.
MVDr. Kamil Kovarčík, Ph.D.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70, 621 00, Brno

Publikace vychází za podpory Ministerstva zemědělství ČR
při České technologické platformě pro zemědělství.

Publikace vznikla na základě poznatků a výsledků získaných během
řešení projektu Ministerstva zemědělství QK1820086 a MZE-RO0518.

2021

ABSTRAKT

Paratuberkulóza (PTB, Johneho choroba) skotu je chronické střevní onemocnění způsobující v chovech skotu významné ekonomické ztráty. Původce onemocnění *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) je spojován i s rozvojem poruch zdraví u lidí, zejména s Crohnovou chorobou.

Nejvnímavější k infekci jsou telata, která se nakazí per os mykobaktériemi pocházejícími z výkalů dospělých jedinců, nebo během intrauterinního vývoje, případně infikovaným kolostrem nebo mlékem. V organismu se MAP množí v makrofázích střevní sliznice. Nahromadění infikovaných makrofágů vede k tvorbě granulomů, které negativně ovlivňují fyziologickou funkci střeva, což vyústí v malabsorpci spojenou s malnutricí a dehydratací postižených zvířat. Progrese infekce prochází od latentní přes subklinickou v klinickou a pokročilou fázi onemocnění. Typická je velmi dlouhá inkubační doba trvající v rozmezí od dvou do deseti let. V prvotních fázích infekce je MAP působením buněčné složky imunitní odpovědi lokalizována ve stěně střeva. S další progresí dochází k rozšíření infekce do těla a vylučování MAP do střeva. Tato fáze infekce je provázena rozvojem protilátek, které lze detekovat v krvi a mléku infikovaných krav. Klinicky se infekce projevuje jako chronický průjem provázený výraznou vyhublostí a v konečném stadium úhynem zvířat. V infikovaných chovech se přistupuje k tlumení infekce.

Mezi rutině využívané diagnostické metody pro posouzení infekčního statusu stáda a k dohledání infikovaných jedinců v rámci tlumení nákazy v chovech patří ELISA test, kultivační vyšetření a PCR. Tyto metody jsou schopny vzhledem k průběhu progrese infekce detekovat jedince až v pozdějších fázích infekce, kdy zvířata produkují protilátky a vylučují MAP výkaly. Tato zvířata jsou terčem opatření namířených k tlumení infekce. Vlastní tlumení nákazy v infikovaných chovech se opírá o dvě základní strategie: prevence přenosu infekce na vnímavé jedince a strategii otestuj-a-vyřaď. Snížení rizika přenosu infekce vyžaduje změny v odchovu telat, které izolují nejmladší jedince z prostředí dospělých zvířat a zabrání zkrmování kolostra a mléka od infikovaných krav. Základem strategie otestuj-a-vyřaď je pravidelné testování starších zvířat a vyřazení infikovaných. Efektivita zaváděných opatření závisí na prevalenci infekce v chovu a míře rizika přenosu infekce vyjádřeného hygienickým standardem v chovu. V chovech s nízkou a velmi nízkou prevalencí infekce jsou z chovu vyřazována i zvířata vylučující menší množství MAP a telata infikovaných matek. Vysoký hygienický standard v chovu umožnuje oddálení vyřazení infikovaných krav z chovu. Samozřejmou součástí tlumení nákazy v chovu je prevence zavlečení infikovaných zvířat a vzdělávání chovatelů k zajištění jejich ochoty respektovat doporučená opatření.

V České republice není známá aktuální nákazová situace PTB v chovech dojeného skotu, ale prvotní studie ukazují poměrné vysoký podíl infikovaných chovů. Vzhledem k uplatňované chovatelské praxi v chovech v ČR byla vypracována metodika tlumení paratuberkulózy v chovech dojeného skotu využívající vyšetření krav v době stání na sucho, před očekávaným termínem porodu. Následně byl vypracován certifikační program pro rozdělení chovů dle míry rizika infekce v nich, který má sloužit k sledování prevalence infekce v rámci chovu a mezi chovy a k zvýšení motivace chovatele tlumit nákazu v chovu.

Klíčová slova:
Mycobacterium avium subspecies *paratuberculosis*; paratuberkulóza; Johneho choroba; dojený skot; tlumení nákazy; certifikační program

ABSTRACT

Paratuberculosis (PTB, Johne's disease) is a chronic intestinal disease causing considerable economic losses in cattle herds. The causative agent *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) is also associated with human health disorders, especially Crohn's disease.

The most susceptible to the infection are calves which become infected orally with MAP from adult faeces, in the uterus or by ingesting MAP in colostrum or milk. MAP infects intestinal macrophages. Clusters of infected macrophages in the intestinal mucosa form granulomas, which results in intestinal dysfunction leading to malabsorption causing malnutrition and dehydration of the affected animals. The infection progresses from latent and subclinical to clinical and advanced stages. Typically, there is a very long incubation period of two to ten years after infection. During the early stages of infection, MAP is localized to the intestinal wall by the action of the cell-mediated immunity. Further progression of the infection leads to the spread of MAP into the body and the shedding in faeces. This stage of infection is associated with the development of antibodies detectable in the blood and milk of infected cows. Clinically, the infection manifests itself as chronic diarrhoea accompanied by emaciation and leading finally to the death of the affected animal. In infected herds, control measures are adopted.

ELISA, PCR and bacterial cultivation are commonly used to evaluate the infectious status of the herd and to detect an infected animal during the implementation of control programmes. Due to the characteristics of infection progression, these tests detect animals in the late stages of infection that produce antibodies or shed MAP in faeces. These animals are the target of control measures. The control programmes are based on two main strategies: prevention of infection transmission and test-and-cull strategy. Changes in the calf rearing system avoiding contact of the youngest animals with the environment of adult cattle and feeding of colostrum or milk from infected dams are required to reduce the risk of infection transmission. Repeated testing of older animals and removal of infected individuals are a cornerstone of the test-and-cull strategy. The effectiveness of the control measures in place depends on the herd prevalence and the hygiene standard that affects the rate of infection transmission. Removal of low and medium shedders or offspring of infected mothers is introduced into herds with low and very low prevalence, respectively. The high standard of herd hygiene allows the delayed removal of infected cows. Prevention of the introduction of infected animals into herds and the education of herd owners to ensure their compliance with control measures are routinely used in control programmes.

The prevalence of MAP infection among dairy herds in the Czech Republic is unknown. However, the results of initial studies showed a relatively high proportion of infected herds. Considering the breeding practices followed in Czech dairy herds, a control programme for paratuberculosis was introduced based on testing of cows in their dry period, i.e. before calving. Subsequently, a certification programme was designed to divide herds according to the risk of infection so as to allow monitoring of prevalence in and among herds and to improve the motivation of herd owners to control paratuberculosis in their herds.

Key words:
Mycobacterium avium subspecies *paratuberculosis;* Johne's disease; dairy cattle; control of paratuberculosis; certification of dairy herds according of MAP prevalence

OBSAH

1. Úvod 9

2. Patogeneze onemocnění 11

3. Epizootologie onemocnění 13

3.1 Infekční agens 13

3.2 Mechanismus přenosu infekce 14

3.2.1 Přenos infekce mezi zvířaty 14

3.2.2 Přenos infekce mezi chovy 19

4. Diagnostické metody 21

4.1. Detekce infekčního agens 21

4.2. Detekce imunitní odpovědi 24

4.2.1 Detekce protilátek 24

4.2.2. Detekce buňkami zprostředkované imunity 25

4.3 Patologická diagnostika 26

4.4 Fenomén ledovce 27

4.5 Korelace výsledků diagnostických metod a patologických změn ve střevě 28

5. Tlumení nákazy 30

5.1 Důvody tlumení nákazy 30

5.2 Diagnostické metody využívané při tlumení nákazy 31

5.2.1 Stanovení diagnózy u klinicky nemocných zvířat 31

5.2.2 Stanovení infekčního statusu stáda 31

5.2.3 Dohledání infikovaných zvířat v chovech 35

5.2.4 Potvrzení statusu neinfikovaného stáda 36

5.3 Obecné principy tlumení infekce 36

5.3.1 Ochota chovatele tlumit nákazu 36

5.3.2 Prevence zavlečení infekce do chovu 37

5.3.3 Tlumení nákazy v infikovaném chovu 37

6. Tlumení MAP v chovech dojeného skotu v ČR 43

6.1 Postup tlumení nákazy v chovech 43

6.2 Certifikační program 44

7. Závěr 49

8. Literatura 51

1. ÚVOD

Paratuberkulóza (PTB, Johneho choroba) je chronické střevní onemocnění postihují chovy skotu po celém světě. Za původce onemocnění byla v roce 1895 Johnem a Frothinghamen označena pomalu rostoucí acidorezistentní tyčinka *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP). K infekci MAP jsou přirozeně vnímaví přežvýkavci, hostitelské spektrum zahrnuje zejména skot, ovce, kozy a vysokou zvěř. MAP byla ale detekována i u jiných druhů zvířat včetně člověka (Carta et al., 2013; Garvey, 2018).

Malá část zvířat je k infekci rezistentní nebo dokáží infekci potlačit. U ostatních infikovaných zvířat se vyvine chronická infekce, která u některých vyústí během produkčního života jedince ve fatální klinické onemocnění (10-15 %). Charakteristická pro paratuberkulózu je dlouhá inkubační doba, která může trvat v rozmezí od dvou do deseti let, než zvířata začnou vylučovat MAP výkaly. V průběhu infekce dochází k postupnému snižování absorpční schopnosti střeva vyúsťující v malnutrici a dehydrataci postižených jedinců. Klinické příznaky se typicky objevují u čtyř až šestiletých zvířat. Onemocnění se projevuje jako chronický průjem provázený progresivním hubnutím a kachexií postižených krav. V současnosti není známa kauzální terapie a zvířata v konečném stadium infekce hynou v důsledku dehydratace a celkového vyčerpání organismu. Většina infikovaných jedinců v chovu je bez zjevných klinických příznaků, ale tato zvířata v důsledku progredující chronické malnutrice neprospívají a trpí nespecifickými zdravotní problémy (mastitida, snížená fertilita, zvýšená citlivost k jiným onemocněním). Bez přítomnosti zvířat s typickými klinickými příznaky může infekce v chovu probíhat dlouho bez povšimnutí a vyústit v míru brakace, kterou není chovatel schopen kompenzovat odchovem jalovic (uzavřený obrat stáda).

Infekce MAP negativně ovlivňuje zdraví a welfare zvířat a způsobuje v chovech skotu významné ekonomické ztráty. Tyto ztráty jsou důsledkem především snížené produkce, předčasné brakace a snížené jateční hodnoty infikovaných zvířat (Garcia & Shaloo, 2015; Ozsvari et al., 2020).

Paratuberkulóza skotu je onemocnění s výrazným negativním vlivem na ekonomiku v chovech skotu. Navíc je MAP spojována s rozvojem poruch zdraví u lidí, což vede k nutnosti kontroly této nákazy.

- Chronické střevní onemocnění provázené průjmem a progresivním hubnutím
- Bez možnosti kauzální terapie, klinické onemocnění končí vždy úhynem zvířete
- Výrazné ekonomické ztráty v chovech skotu
- Poruchy zdraví lidí (Crohnova choroba, ulcerózní kolitida)

2. PATOGENEZE ONEMOCNĚNÍ

Zvířata se infikují per os mykobaktériemi pocházejícími z kolostra, mléka nebo z výkalů infikovaných dospělých jedinců. Vstupní branou infekce do těla jsou microfold (M) buňky Peyerových plaků nebo enterocyty, přednostně však M buňky. Tyto buňky přemístí MAP z lumenu střeva do spodní vrstvy sliznice (lamina propria), kde jsou fagocytovány makrofágy a rezidentními dendritickými buňkami. (Arsenault et al., 2014; Koets et al., 2015)

Fagocytóza MAP může vyústit v lýzu mykobaktérií nebo perzistentní infekci makrofágů. Tyto buňky tak hrají v patogenezi onemocnění dvojí roli. Jsou hlavními efektorovými buňkami odpovědné za destrukci MAP, na druhé straně jsou i místem přežívání a pomnožení mykobaktérií a zdrojem šíření infekce v organismu. Mykobaktérie modulují imunitní funkce infikovaných makrofágů a dendritických buněk, tak aby bylo zajištěno příznivé prostředí pro jejich pomnožení a přežívání v nich.

V perzistentně infikovaných buňkách dochází k replikaci MAP (intracelulární patogen). Po překročení velikostní kapacity buňky nastane její lýza spojená s vyplavením MAP do okolní tkáně. Uvolněné MAP jsou následně fagocytovány přicestovanými makrofágy a dendritickými buňkami. Celý cyklus se násobně opakuje. Nahloučené infikované makrofágy tvoří základ formujících se granulomů, které společně s velkým množstvím přicestovalých makrofágů negativně ovlivňují vstřebávání vody a živin ze střeva. MAP uvolněné do mezibuněčného prostoru mohou být zdrojem nových vzdálených střevních lézí, být vyloučeny do lumenu střeva nebo být zaneseny lymfou do lokálních drénujících mízních uzlin. V pokročilém stádiu infekce můžou MAP proniknout krví do jiných částí organismu (děloha, mléčná žláza, fétus). V pozdějších fázích infekce spojené s čestnými granulomatózními lézemi ve stěně střeva může dojít k obstrukci lymfatických cév střeva a jejich fistulaci do luminu střeva.

Průběh infekce je u vnímavých jedinců výsledkem interakce mezi MAP a imunitní reakcí na ni. U zvířat se infekce může vyvinout v pomalu progredující perzistentní infekci (dlouhodobá subklinická infekce, neprogresivní forma onemocnění) nebo u nich může dojít k rozvoji klinického onemocnění (progresivní forma onemocnění).

Pro perzistentní infekci je charakteristická nízká úroveň buněčné i prolilátkové imunitní odpovědi a vylučování obtížně detekovatelného množství MAP ve výkladech. Nižší rychlost pomnožování MAP je spojena s malým počtem infikovaných makrofágů a zanedbatelným množstvím MAP uvolněných do sliznice střeva.

Tabulka 1. Charakteristika jednotlivých fází Johneho choroby

Fáze infekce	Klinické příznaky (KP)	Vylučování MAP (CFU/g)*	Protilátky	Poměrné zastoupení zvířat v infikovaném chovu**
Latentní	Bez KP	Nevylučují, nebo nedetekovatelné množství	Ne	Méně než součet zvířat v klinické a rozvinuté fázi infekce
Subklinická	Nespeficické poruchy zdraví, snížená produkce	Občasné malé množství (10-35)	Ne, nebo malé množství	4-8
Klinická	Progresivní hubnutí, průjem, snížená produkce	Kontinuální (35-75)	Ano	1-2
Pokročilá	Kachexie, dehydratace, úhyn	Kontinuální velké množství (>75)	Ano, velké množství	1

Legenda: CFU = jednotka tvořící kolonii (colony forming unit), *Vylučované množství MAP převzato od Magombedze et al. 2017, **Zastoupení zvířat v jednotlivých fázích infekce převzato od Magombedze et al. 2013

Vyšší rychlost pomnožování MAP v makrofázích v průběhu progresivní infekce vede k vysokému počtu infikovaných makrofágů a volných MAP uvolněných do sliznice střeva. Imunitní systém v počátcích infekce reaguje aktivací buněčné složky imunitní odpovědi zajišťující lýzu infikovaných makrofágů. S progresí onemocnění a stoupajícím počtem volných MAP roste protilátková složka imunity, která však nemá protektivní účinek (Magombedze et al., 2016; Magombedze et al., 2017).

- MAP se množí a přežívají především v makrofázích (intracelulární patogen)
- MAP modulují imunitní reakci infikovaných makrofágů
- Kumulace infikovaných makrofágů v tkáních střeva, tvorba granulomů
- Snížení vstřebávaní živin ze střeva

Fáze Johneho choroby

Průběh Johneho choroby od nakažení po uhynutí zvířat je rozdělen do několika fází: latentní, subklinické, klinické a pokročilé. V latentní fázi infekce zvířata nevylučují MAP ani u nich nejsou patrné žádné známky onemocnění. Během subklinické fáze onemocnění dochází k občasnému vylučování malého množství MAP ve výkalech, zvířata neprospívají a trpí nespecifickými poruchami zdraví (mastitidy, poruchy reprodukce, zvýšená citlivost k jiným onemocněním), na jejichž vzniku se podílí více příčin. V klinické fázi infekce zvířata trpí klinickými příznaky typicky spojovanými s paratuberkulózou: progresivní hubnutí se zachováním apetitu, profúzní průjem bez nepříjemného zápachu, homogenní kašovité konzistence bez příměsí krve, hlenu a zbytků epitelu. Zvířata trpí dehydratací a více pijí. U postižených zvířat bývá patný mezisaničí otok. Další progrese onemocnění vede v pokročilé fázi infekce k těžké dehydrataci, vychrtlosti a úhynu zvířat na celkové vyčerpání organismu.

Charakteristiké znaky jednotlivých fází Johneho choroby jsou souhrnně uvedeny v Tabulce 1.

3. EPIZOOTOLOGIE ONEMOCNĚNÍ

Vznik, šíření a zánik infekčního onemocnění je určen vlastnostmi patogenního agens, hostitele a prostředí. Tyto tři činitelé na sebe navzájem působí a vytváří tak podmínky pro přenos a průběh infekce. Mezi nejvýznamnější faktory ovlivňující průběh onemocnění patří především: vlastnosti infekčního agens (MAP), velikost infekční dávky, citlivost hostitele k infekci a mechanismus přenosu infekce

3.1 INFEKČNÍ AGENS (MAP)

MAP patří společně s patogeny lidí a zvířat *(Mycobacterium leprae, Mycobacterium tuberculosis)* a mykobaktériemi volně žijícími v prostředí do čeledi *Mycobacteriacae*, rodu *Mycobacterium*. Další systematické členění řadí MAP do komplexu *Mycobacterium avium* (*Mycobacterium avium complex*, MAC) obsahující 2 druhy *(M. avium a M. intracellulare)* z nichž *M. avium* se dále dělí na celkem 4 podruhy: *M. avium subsp. paratuberculosis, M. avium subsp. hominissuis* (MAH), *M. avium subsp. avium* (MAA) a *M. avium subsp. silvaticum* (MAS). Všechny podruhy jsou geneticky podobné, liší se hostitelským spektrem a schopností vyvolávat onemocnění. Z výše jmenovaných jsou kromě MAP významné dva podruhy: MAA vyvolává tuberkulózu ptáků, MAH vyvolává onemocnění u lidí trpících AIDS.

Na základě genetické analýzy byli původně rozlišeny dva typy MAP: C (Cattle Type) a S (Sheep Type) pojmenovaných podle druhu zvířat, z kterých byly primárně izolovány (Matthews et al., 2021). S nárůstem počtu nových izolátů i od jiných druhů zvířat bylo toto členění opuštěno a nahrazeno typy I, II a III. Kde typ I a III je izolován především od ovcí a typ II od skotu, vysoké zvěře, bizonů a případně člověka (Bannantine et al., 2020). Podrobně jsou jednotlivé kmeny MAP typizovány sekvenační analýzou. Typizací kmenů v chovech bylo zjištěno, že na infekci se může podílet více kmenů, kdy jeden z kmenů může mít dominantní zastoupení (Schukken et al., 2015). Jednotlivé kmeny se mohou lišit svými vlastnostmi (virulence, patogenita, schopnost přežívat ve vnějším prostředí atd.). V infikovaných chovech je ale nesnadné určit, zda infekce rozdílnými kmeny vede k vyšší prevalenci infekce v chovu (Barkema et al., 2018).

MAP je pomalu rostoucí (generační čas nutný pro buněčnou replikaci přesahuje 20 hodin) nesporulující Gram pozitivní acidorezistetní tyčka. Typickou vlastností MAP je existence unikátní komplexní lipidové silné buněčné stěny, která přímo určuje její rezistenci ve vnějším prostředí. MAP je obligátním intracelulárním patogenem trávicího traktu. Na rozdíl od jiných mykobaktérií nedokáže syntetizovat mykobaktin, siderofor nutný pro příjem železa z prostředí, a proto není schopna replikace mimo tělo hostitele.

Z epizootologické hlediska je důležitou vlastností především schopnost MAP přežívat ve vnějším prostředí. Uvádí se, že MAP obsažené ve výkalech můžou přežívat 152 až 246 dní (Manning & Collins, 2001). Tato doba může být zkrácená působením slunečního svitu (UV), vysušením infikovaného materiálu, případně zvýšením pH (pH>7). Kromě prostor stájí MAP kontaminuje půdu pastvin a vodní zdroje.

MAP je poměrně termorezistentní a může přežít pasteraci to společně s vyšší rezistencí k chlóru může vést ke kontaminaci potravního řetězce lidí.

- MAP je podruh komplexu *Mycobacterium avium*
- Acidorezistentní tyčka s unikátní komplexní lipidovou stěnou
- MAP není schopna replikace ve vnějším prostředí, kde dlouhodobě přežívá

3.2 MECHANISMUS PŘENOSU INFEKCE

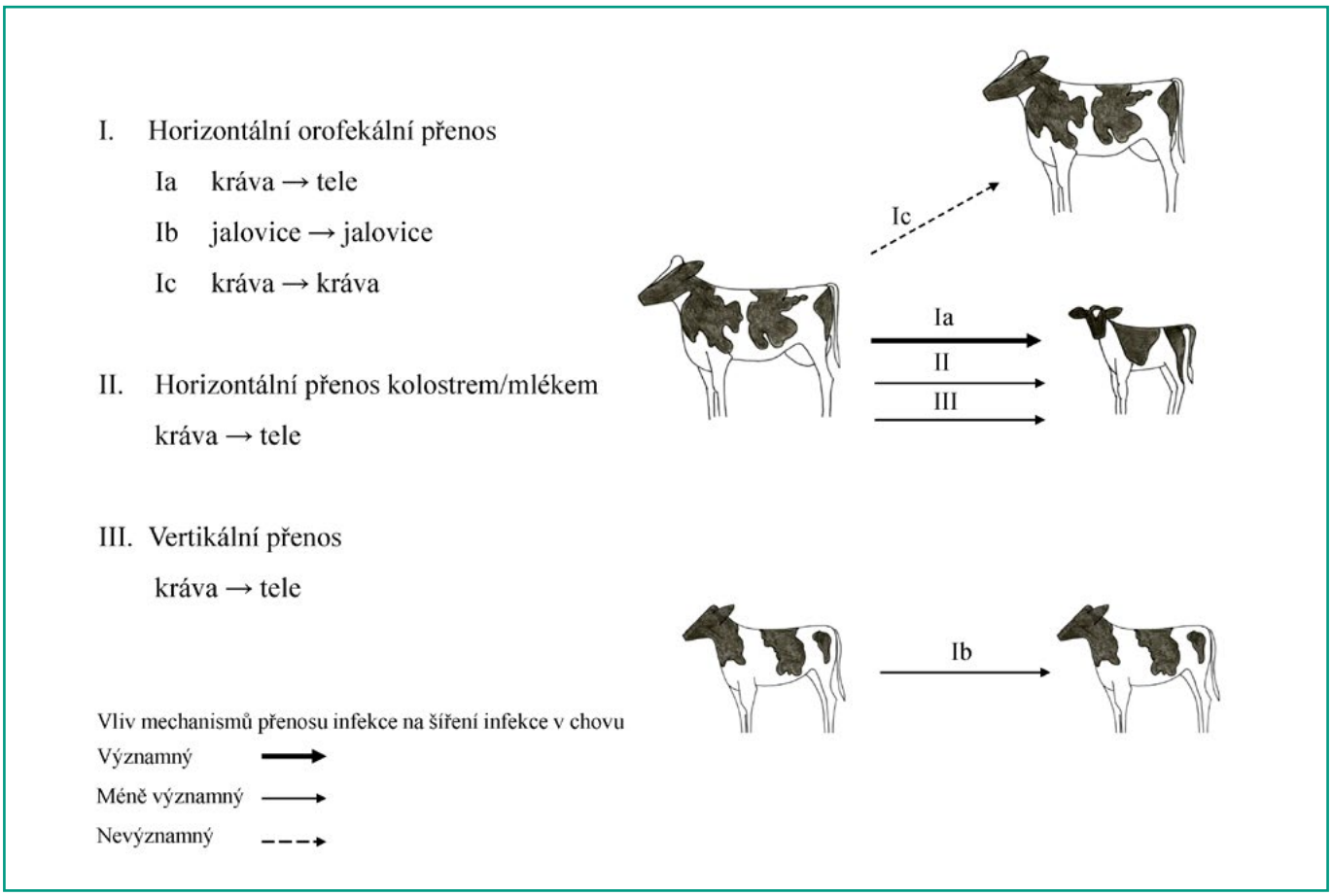
K přenosu infekce dochází v rámci jednoho chovu šířením mezi zvířaty nebo mezi jednotlivými chovy.

3.2.1 Přenos infekce mezi zvířaty

Mezi zvířaty se MAP přenáší horizontálně i vertikálně. Horizontálně se zvířata nakazí per os pozřením MAP pocházejících z výkalů infikovaných zvířat (orofekální cesta infekce) nebo MAP vylučovanými do kolostra a mléka. Mléko může být kontaminováno MAP vylučovanými přímo do mléka infikovaným zvířetem jako důsledek bakteriémie, mobilizovanými makrofágy pocházejícími z infikované supramamární lymfatické uzliny, nebo nepřímo mykobaktériemi pocházejícími z prostředí (Pithua et al., 2011). Horizontální přenos mezi zvířaty je uskutečněn přímým kontaktem s infikovaným zvířetem nebo nepřímo prostřednictvím kontaminovaného prostředí. Vertikálně je infekce přenášena z matky na plod (transplacentární, intrauterinní infekce). U infikovaných býků bylo prokázáno intermitentní vylučování malého množství MAP semenem, ale přenos infekce semenem nebyl zatím prokázán (Fechner et al., 2017; Müster et al., 2013).

Tyto jednotlivé mechanismy přenosu ovlivňují rychlost šíření infekce mezi zvířaty v infikovaných chovech. Sledování dynamiky šíření infekce přímo v infikovaném chovu je vzhledem k dlouhé inkubační době a nízké citlivosti diagnostických metod detekovat infikovaná zvířata velmi obtížné. Proto se pro její hodnocení hojně využívají modelové studie. Tyto modelové studie reflektují poznatky o šíření MAP u infikovaných zvířat a v chovech. Jejich cílem je odhalit možné mechanismy šíření infekce v prostředí chovů a ohodnotit jejich vliv na míru rozšíření infekce v chovu (prevalence). S novými poznatky roste komplexnost těchto modelů. Výsledky modelování jsou pak konfrontovány s reálnou situací v infikovaných chovech, aby byla otestována jejich relevance.

Autoři Al-Mamun et al. (2016) vytvořili model chovu s 1000 dospělými zvířaty, uzavřeným obratem stáda,



Obrázek 1: Schématické znázornění šíření infekce v chovu dojeného skotu

zohledňujícím odlišnou chovatelskou praxi a prostorově oddělené ustájení jednotlivých kategorií zvířat. Do tohoto modelového chovu byla integrována MAP infekce s počáteční prevalencí 1 % a následně sledováno šíření infekce mezi zvířaty. Model zahrnoval následující cesty přenosu infekce: z dospělé krávy na dospělou krávu, z krávy na tele (orofekální přenos), z krávy na tele kolostrem nebo mlékem, z telete na tele, z jalovice na jalovici a z matky na tele (transplacentární přenos). Ve 24 % všech modelových simulací došlo v infikovaném chovu k pomalému spontánnímu vymizení infekce během 10–17 let. V ostatních případech model předpovídal zvýšení prevalence na 49 % po 22 simulovaných letech.

Ohodnocením relevance jednotlivých mechanismů přenosu infekce mezi zvířaty bylo zjištěno, že klíčovým pro perzistenci infekce v chovu byl horizontální přenos z krávy na tele (orofekální) následovaný infekcí telat kolostrem a mlékem (Obrázek 1). Prevalence infekce v chovu je nejvíce ovlivněna přenosem infekce zvířaty vylučující vysoké množství MAP. K perzistenci infekce v infikovaném chovu přispívá i vertikální přenos infekce a přenos mezi jalovicemi (Al-Mamun et al., 2016).

Vertikální přenos infekce sám o sobě je dostatečným mechanismem přenosu vedoucím k perzistenci infekce v chovu (Lu et al., 2008). Na vertikálním přenosu infekce se podílí krávy ve všech fázích infekce, ale pravděpodobnost vertikálního přenosu u subklinicky infikovaných zvířat je nižší než u krav v klinické fázi infekce. Shodně s horizontálním přenosem je tak prevalence infekce v chovu ovlivněna hlavně vertikálním přenosem infekce kravami vylučujícími větší množství MAP. Vzhledem k individuální rezistenci zvířat k infekci, mohou již některé jalovice vylučovat MAP a být tak infekční pro společně ustájená zvířata. Nicméně se zvyšujícím se věkem a paritou zvířat roste riziko vylučování MAP infikovanými zvířaty a tím i riziko nákazy citlivých zvířat. Ostatní mechanismy přenosu, z krávy na krávu a z telete na jiné tele mají na perzistenci infekce v chovu minimální vliv (Al-Mamun et al., 2016). Tato zjištění kolidují s věkovou rezistenci zvířat rostoucí s věkem a s vylučováním malého množstvím MAP mladými zvířaty.

Závěry výše uvedené studie autorů Al-Mamun et al. (2016) byly podpořeny i jinými pracemi. Například Marce et al. (2011) shodně publikovali minimální přenos infekce mezi telaty a označili za hlavní mechanismus přenosu infekce v infikovaném chovu horizontální přenos MAP kontaminovaným prostředím a vertikální přenos z krávy na tele. Dominantní vliv kontaminovaného prostředí při horizontálním přenosu infekce oproti přímému kontaktu mezi zvířaty byl popsán i ve studii Kirkeby et al. (2018). Naproti tomu Smith et al. (2015) zmiňují vyšší pravděpodobnost přenosu infekce mezi dospělými zvířaty, autoři ale současně předpokládají, že infekce dospělých zvířat u nich nevyústí ve vylučování velkého množství MAP, což limituje jejich význam při přenosu infekce v chovu a je tak ve shodě s výše zmiňovanými studiemi.

Šířením infekce v chovu se zabývali i práce několika autorů předpokládající zavlečení jediného infikovaného zvířete do chovu. Výsledky těchto studií předpokládají možnost spontánního vymizení infekce z chovu. Marce et al. (2011) detekovali 66 % pravděpodobnost spontánního vymizení infekce při zavlečení jediného infikovaného zvířete. Dále zjistili, že tato pravděpodobnost je ovlivněna délkou pobytu zvířat v klinické fázi infekce v chovu. Tato zvířata vylučují MAP do prostředí, které je hlavním zdrojem infekce. V případě, že došlo ke kontaminaci stájového prostředí, bylo spontánní vymizení infekce velice nepravděpodobné. Model dále předpověděl, že pokud se v chovu objeví jedno klinicky nemocné zvíře během pěti let, je pravděpodobnost vymizení infekce 48 %. Pokud není detekováno žádné takové zvíře, je tato pravděpodobnost až 99 %. Kirkeby et al., 2017 publikovali 82 % pravděpodobnost spontánního vymizení infekce po 10 letech od zavlečení jediného infikovaného zvířete do chovu a 46 % při zavlečení deseti takových zvířat. Výsledky těchto studií se liší v závislosti na nastavení parametrů přenosu infekce v podmínkách modelových chovů. Nutno dodat, že tyto studie vychází z předpokladu zavlečení infikovaného zvířete do neinfikovaného chovu. Pokud je infekce v chovu přítomna po delší čas (endemicky infikovaný chov) k spontánnímu vymizení infekce nedochází.

- Horirontální přenos infekce mezi zvířaty ingescí MAP pocházejících z výkalů (orofekální přenos), kolostra nebo mléka
- Vertikální přenos infekce z matky na plod
- Klíčový mechanismus přenosu přenos MAP z dospělých krav na telata orofekální cestou nebo kolostrem a mlékem
- Vertikální přenos infekce dostačující k perzistenci infekce v chovu
- Hlavním mechanismem přenosu nepřímá infekce zvířat mykobaktériemi z prostředí

Velikost infekční dávky

Velikost infekční dávky je dána množstvím MAP vylučovaných infikovanými zvířaty ve výkalech, mléku/kolostru případně množstvím MAP přenesených z matky na plod při inrauteriním přenosu infekce. MAP pocházející z výkalů představují zdroj kontaminace prostředí. Množství MAP v prostředí je ovlivněno zoohygienickými podmínkami v chovu.

K vylučování MAP výkaly dochází již v subklinické fázi infekce. V této fázi je občasně vylučováno malého množství MAP (Tabulka 1). S postupnou progresí onemocnění jsou MAP vylučovány častěji a ve větším množství. V klinické a pokročilé fázi infekce dochází ke kontinuálnímu vylučování velkého množství MAP. Vzhledem k množství (vyjádřeného počtem jednotek tvořící kolonie, Colony Forming Units, CFU) vylučovaných MAP v gramu výkalů detekovaných kultivačním vyšetřením lze zvířata rozdělit na jedince vylučující malé množství MAP (<10 CFU/g), vylučující středně velké množství MAP (10-50 CFU/g) a jedince vylučující velké množství MAP (>50 CFU/g) (McAloon et al., 2019). Krávy vylučující 10 000 a více CFU v gramu výkalů, jsou označovány jako „super-shedders" nebo „high shedders" (masivně vylučující krávy, super vylučovatelky) a jsou hlavním zdrojem infekčního agens pro vnímavá zvířata. Podíl zvířat v chovu masivně vylučujících MAP je velmi nízký, okolo jednoho procenta (Aly et al., 2012).

Sledováním dynamiky vylučování MAP výkaly v čase byly odhaleny dva vzorce vylučování: 1. neprogresivní charakterizovaný dlouhodobým občasným vylučováním malého množství MAP a 2. progresivní vyjádřený kontinuálním vylučováním zvyšujícího se množství MAP (Ceres et al., 2020; Smith et al., 2015). Rozdíly ve vylučování jsou odrazem rozdílného průběhu infekce u infikovaných zvířat: progresivní a neprogresivní forma infekce. Neprogresivní onemocnění je kromě výše uvedeného vzorce vylučování spojeno s absencí detekovatelného množství Ab a projevů klinického onemocnění. Naproti tomu u progresivní formy onemocnění jsou pozorovány klinické příznaky onemocnění doprovázené růstem vylučovaného množství MAP výkaly a zvyšujícím se množstvím Ab v séru (Schukken et al., 2015).

Do mléka/kolostra je MAP vylučována přímo infikovanými zvířaty prostřednictvím infikovaných makrofágů pocházejících z infikovaných mízních uzlin mléčné žlázy nebo z krve (bakteriémie). MAP v mléku lze detekovat už u asymptomatických zvířat, ale počet mykobaktérií v mléce roste společně s množstvím MAP vylučovaných výkaly během progrese onemocnění (Sweeney et al., 1992).

S postupnou progresí infekce roste i pravděpodobnost přenosu infekce z matky na plod. U zvířat v subklinické fázi infekce je pravděpodobnost transplacentárního přenosu infekce přibližně 9 %, v klinické fázi průměrně 39 %, ale může dosáhnout až 60 % (Whittington & Windsor, 2009).

MAP vyskytující se v prostředí mohou kontaminovat pomůcky používané k napájení a krmení zvířat nebo přímo kontaminovat krmivo a napájecí vodu. Množství MAP v prostředí je ovlivněno jednak počtem krav vylučujících MAP a množstvím MAP vylučovaných výkaly těchto krav, ale i frekvencí a důkladností odklízení chlévské mrvy. Na základě zoohygienických podmínek v chovu je lze rozdělit na chovy s dobrou úrovní zoohygieny spojenou s nižší rychlostí přenosu infekce a na chovy se špatnou, nedostatečnou úrovní zoohygieny napomáhající rychlejšímu přenosu infekce (Lu et al., 2008).

- Dle množství MAP ve výkalech krávy vylučují malé (<10 CFU/g) střední (10-50 CFU/g) a velké (>50 CFU/g) množství MAP
- Super vylučovatelky („super-shedders“) vylučují >10 000 CFU/g výkalů
- Zvířata s progresivním nárůstem počtu vylučovaných MAP (progresivní forma infekce)
- Zvířata dlouhodobě vylučující velmi malé množství MAP (neprogresivní forma infekce)
- S progresí infekce roste počet MAP vylučovaných mlékem a pravděpodobnost transplacentárního přenosu infekce
- V chovech s dobrou úrovní zoohygieny je nižší pravděpodobnost přenosu infekce

Citlivost/rezistence zvířat k infekci

Citlivost k infekci je ovlivněna věkem zvířat a jejich genetickým založením. Uměle může být rezistence k infekci zvýšena vakcinací.

Věková rezistence k infekci

U paratuberkulózy je popsána věková rezistenci k infekci (Windsor & Whittington, 2010). Nejvíce vnímavá k infekci jsou novorozená telata. S věkem roste rezistence zvířat k infekci a uvádí se, že v jednom roce věku, je míra rezistence k infekci mladých jedinců a dospělého skotu shodná.

Vzhledem k nevyzrálosti imunitního systému mají telata nižší kapacitu reagovat na infekci, navíc u telat infikovaných vyšší infekční dávkou, dochází k vyšší míře poškození funkcí imunitního systému působením MAP. Infekce nižší infekční dávkou vyústí v méně závažné poškození organismu. Tato závislost na infekční dávce je nejvíce vyjádřena u nejmladších zvířat (do 6 měsíců stáří). Vyšší infekční dávka u telat s vyzrálejším imunitním systémem vyvolá silnou reakci buněčné složky imunity s protektivním účinkem proti šíření MAP v organismu (Mortier et al., 2015).

Věková rezistence zvířat je spojována, kromě nezralosti imunitního systému telat i s počtem M buněk sloužících k přestupu MAP z lumina střeva do organismu. Vyšší počet M buněk zvyšuje množství MAP infikující střevní sliznici. Počet těchto buněk je díky přítomnosti kontinuálního Peyerova plaku v ileu telat mnohem vyšší. Tato lymfatická tkáň postupně do 18 měsíců věku zvířat involuje (Koets et al., 2015). Obecně platí, že věk, kdy je zvíře infikováno společně s velikostí infekční dávky ovlivňuje průběh infekce. Infekce v ranějším věku vyšší infekční dávkou vyústí v horší průběh infekce s časnější progresí onemocnění a vylučováním velkého množství MAP (Mitchell et al., 2012; Mortier et al., 2015).

Nejvnímavější k infekci jsou zvířata do jednoho roku stáří, ale byla prokázána i možnost infekce dospělých zvířat, zvláště krav společně ustájených s masivně vylučujícími jedinci (Schukken et al., 2015). Espejo et al. (2013) ve své studii prokázali infekci krav přesunutých z neinfikovaných do infikovaných chovů a zjistili, že s dobou strávenou v infikovaném chovu roste i pravděpodobnost infekce těchto krav. Nutno ale dodat, že pravděpodobnost infekce dospělých krav je násobně nižší než infekce mladých zvířat. Navíc úloha zvířat infikovaných v dospělosti v šíření infekce v chovu není vyjasněna. Předpokládá se, že tato zvířata nevylučují vysoké množství MAP ani se u nich nerozvinou klinické příznaky onemocnění. Vzhledem k dlouhé inkubační době onemocnění jsou z chovu pravděpodobně vyřazena dříve, než u nich dojde k progresi onemocnění do klinické fáze.

Genetická rezistence k infekci

Dalším faktorem ovlivňujícím průběh onemocnění je přirozená rezistence jedince k infekci. Zvířata vystavená působení MAP mohou být infikována, nebo jsou k infekci rezistentní, u infikovaných zvířat jsou pak rozdíly v závažnosti onemocnění. Bylo zjištěno, že rezistence/citlivost k infekci MAP daného jedince je dědičná a přenáší se na potomky. Vyřazováním infikovaných (citlivých k infekci) krav během tlumení infekce v infikovaných chovech má tak příznivý efekt na rezistenci potomků k infekci. Nicméně genetický efekt založený na vyřazování pozitivních matek je velice malý (Hulzen et al., 2014).

S rozvojem molekulárně genetických metod a sekvenací celého genomu skotu se v posledním desetiletí studie zaměřují především na detekci specifických rozdílů (single nucleotide polymophism, SNP) u kandidátních genů (především geny angažované v přirozené obraně organismu proti MAP) nebo celého genomu zvířat citlivých/rezistentních k infekci. Tyto studie předkládají možnost genetické selekce zvířat s vyšší rezistencí k infekci MAP (Canive et al., 2020; Juste et al., 2018).

Vakcinace

Další možností zvýšení rezistence zvířat k infekci je umělé navození specifické imunity vakcinací. Vakcíny jsou využívány především k snížení ekonomických ztrát v infikovaných chovech zmírněním závažnosti klinických příznaků onemocnění.

Současné běžné komerční vakcíny Mycopar (Boehringer Ingelheim), Gudair (CZ Veterinaria) a Silirium (Pfizer) obsahují inaktivované MAP. Vakcinace těmito celobuněčnými vakcínami vede u vakcinovaných zvířat k interferenci s tuberkulinovým kožním testem používaným k diagnostice tuberkulózy skotu (*M. bovis*), což výrazně omezuje jejich použitelnost. Dalším z vedlejších účinků těchto vakcín je tvorba granulomů v místě vpichu.

Vakcinace zvyšuje imunitní odpověď organismu, která může vést až k zastavení progrese patologických změn ve střevě. To se projeví snížením počtu vylučovaných MAP ve výkalech, zvýšením produkce zvířat a prodloužením přežívání infikovaných jedinců (Gupta et al., 2019; Juste et al., 2009). Lu et al. (2013) ve své modelové studii ukázaly, že vakcinace telat snižuje potenciální pravděpodobnost zavlečení infekce do neinfikovaných chovů. Tato pravděpodobnost roste s účinností vakcíny. Vakcinace telat zvyšuje jejich rezistenci k infekci, a tím snižuje pravděpodobnost horizontálního přenosu infekce a ve svém důsledku i počet infikovaných zvířat v chovu. Avšak i při modelovém testování velice nepravděpodobně dosažitelné 100 % účinnosti vakcíny

byl prokázán přenos infekce dostačují k perzistenci infekce v chovu. Autoři uvádějí, že k tlumení infekce v chovu musí být kromě vakcinace dodržována i další opatření, a to zejména redukce počtu začleňovaných infikovaných zvířat do chovu, minimalizace přenosu infekce kravami vylučujícími velké množství MAP a snížení rizika vertikálního přenosu.

Ideální vakcíny by měly navozovat dostatečnou imunitní odpověď potřebnou k tlumení infekce bez vedlejších účinků. Dalším požadavkem při vývoji vakcín proti Johnově chorobě je vzhledem ke strategii tlumení infekce založené na detekci a odstranění infikovaných zvířat, možnost odlišení infikovaných od vakcinovaných zvířat.

Velká pozornost je v současnosti při vývoji nových vakcín věnována detekci imunogenních proteinů vyvolávajících produkci interferonu gama (INF-γ), který stimuluje protektivní buněčnou složku imunitní odpovědi. Experimentální studie se subjednotkovými vakcínami prokázaly dostatečnou efektivitu v tlumení infekce bez negativní interference s tuberkulinovým testem. (Stabel & Bannantine, 2021).

Přístup k využití vakcinace během tlumení infekce v různých zemích je odlišný. V některých zemích se vakcinace běžně využívá, zatímco v jiných je její využití striktně regulováno státem nebo je zakázáno (Gupta et al., 2019; Barkema et al., 2018). Více je vakcinace využívána při tlumení Johneho choroby u malých přežvýkavců, u ovcí a koz. V České republice není v současné době registrována žádná vakcína proti paratuberkulóze skotu.

- Věková rezistence k infekci v závislosti na vlastnostech imunitního systému telat
- Přirozená geneticky podmíněná rezistence zvířat k infekci
- Možnost zvýšení rezistence zvířat vakcinací
- Samotná vakcinace nezabrání perzistenci infekce v chovu

3.2.2 Přenos infekce mezi chovy

Nejčastějším zdrojem infekce mezi chovy je zavlečení infikovaného zvířete do chovu (Kirkeby et al., 2017; Rangel et al., 2015). Vzhledem k dlouhé inkubační době a omezené citlivosti diagnostických metod detekovat infikovaná zvířata v počátečních fázích infekce mohou být zvířata, zařazená do chovu a identifikována jako negativní (nedetekovatelné množství vylučovaných MAP, bez Ab zjistitelných ELISA testem) infikovaná (falešně negativní zvířata). Tato zvířata mohou být v latentní nebo subklinické fázi infekce. K progresi infekce provázené klinickými příznaky onemocnění může dojít až po dlouhé době vylučování MAP těmito zvířaty.

Nová zvířata jsou zařazována do chovů z různých příčin: koupě geneticky cenných zvířat, rozšíření velikosti stáda, repopulace stáda v důsledku zvýšené brakace/mortality zvířat nebo neschopnost vyprodukovat dostatečné množství jalovic nutných pro obnovu počtu dojených krav. Zvířata mohou být do chovu začleněna jednorázovým nebo kontinuálním nákupem zvířat.

Kirkeby et al. (2017) pomocí simulačního modelování zjistili, že pokud jsou do chovu s počáteční prevalencí okolo 5 % zařazována zvířata z chovů s nízkým rizikem infekce (0–5 % pravděpodobnost že nakoupené zvíře je infikované) nedochází k zvýšení počtu infikovaných zvířat v chovu. Pokud jsou do tohoto chovu zařazena zvířata z chovů s vyšším rizikem infekce, prevalence se výrazně zvýší. Nákup zvířat zvýší prevalenci infekce v chovu proporcionálně s pravděpodobností, že je kupované zvíře infikované (prevalence infekce v chovu, ze kterého pochází nakoupené zvíře) a počtem infikovaných zvířat začleněných do chovu. Přenos infekce z chovu na chov je tak ovlivněna prevalencí infekce v chovech, z kterých pochází nakupovaná zvířata, frekvencí nákupů a počtem nakoupených zvířat. Do již infikovaných chovů nákup zvířat z chovů s nízkým rizikem infekce výrazně neovlivní prevalenci infekce v chovu. Pravděpodobnost zavlečení infekce do neinfikovaného chovu stoupá s počtem nakoupených zvířat. Pokud jsou zvířata kupována z chovů s nízkým rizikem infekce a je zakoupeno jediné zvíře, je pravděpodobnost zavlečení infekce nízká. Ale pokud jsou zvířata zařazována

do chovu pravidelně, stoupá riziko zavlečení infikovaného jedince.

Z uvedených výsledků vyplývá, že k minimalizaci rizika zavlečení infekce do neinfikovaného chovu nebo případného zvýšení prevalence infekce v již infikovaném chovu je nutno znát nákazovou situaci chovů, z kterých pocházejí nakupovaná zvířata. Nákup zvířat z chovů s neznámou nákazovou situací je vzhledem k zavlečení infekce/infikovaných zvířat do chovu velmi rizikový.

- Zavlečení nákazy do chovu infikovaným zvířetem
- Zvíře vyšetřené v době nákupu jako negativní (bez Ab, nevylučuje MAP) může být infikované
- S vyšším počtem nakoupených zvířat a vyšší frekvencí nákupu zvířat roste riziko zavlečení infekce do chovu
- Nákup zvířat z chovů s neznámou nákazovou situací je vzhledem k šíření infekce vysoce rizikový

4. DIAGNOSTICKÉ METODY

V zásadě lze diagnostické testy rozdělit na metody detekující přímo přítomnost patogenního agens nebo nepřímo imunitní reakci tímto patogenem vyvolanou. Mezi rutině využívané testy patří z přímých metod především detekce MAP ve vzorcích výkalů kultivačním vyšetřením a PCR z nepřímých pak průkaz protilátek (Ab) ELISA testem (Tabulka 2). V rámci kontroly nákazy v chovu se diagnostické metody užívají k několika účelům: identifikace infekčního agens u klinicky nemocných zvířat, identifikaci infikovaných zvířat a ke zjištění nákazového statusu stáda. U uhynulých nebo poražených zvířat se provádí pitva.

U každé diagnostické metody je určena její citlivost (senzitivita, Se) a specifita (Sp). Citlivost diagnostické metody odpovídá pravděpodobnosti pozitivního výsledku testu u infikovaných zvířat. Specifita vyjadřuje pravděpodobnost negativního výsledku u zdravého, neinfikovaného zvířete. Hodnoty Se, Sp lze vyjádřit číslem (0–1) nebo procenty (0–100 %), kdy hodnota 1 odpovídá 100 %.

4.1 DETEKCE INFEKČNÍHO AGENS

MAP ve vzorku může být detekována pomocí kultivačního vyšetření nebo metodou PCR.

Kultivační vyšetření

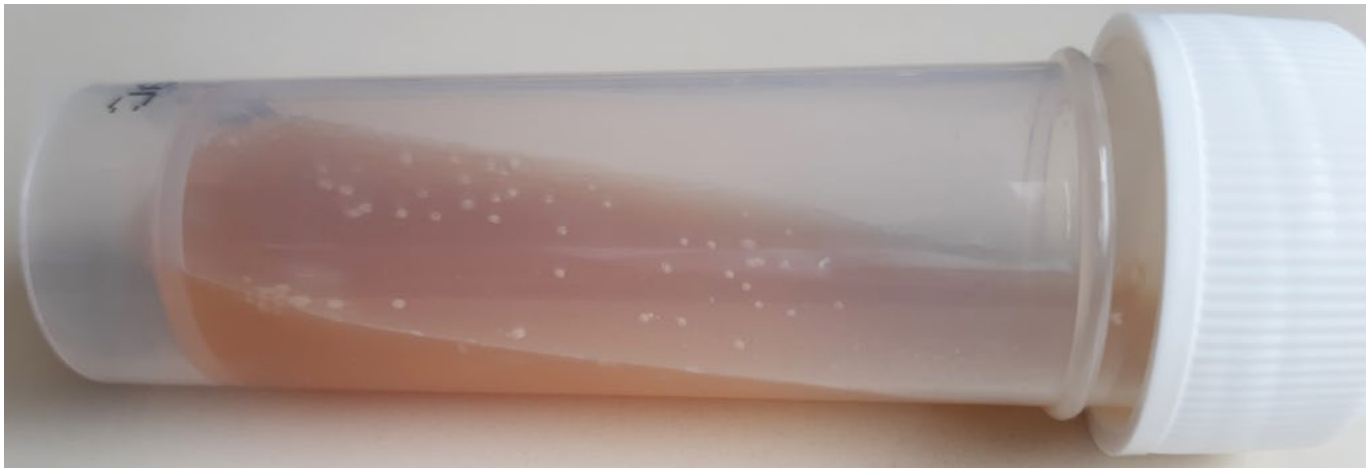
Principem kultivačního vyšetření je detekce živých mykobaktérií pocházejících především z výkalů zvířat, které se pomnoží in vitro na pevných nebo v tekutých půdách.

MAP je pomalu rostoucí Gram pozitivní fakultativně aerobní acidorezistentní tyčka, která je od vnějšího prostředí izolována unikátní lipidovou stěnou. MAP vyžaduje k růstu v kultivačních médiích přídavek mykobaktinu (siderofor nutný pro příjem železa). Před vlastní kultivací je nutno vzorek výkalů dekontaminovat od rychle rostoucí bakteriální flóry běžně se vyskytující ve střevech zvířat. Dekontaminace vzorku může vést ke snížení počtu MAP až o cca 3 $\log_{10}$ (OIE Terrestrial Manual OnLine Access, 2021). K viditelnému nárůstu bakterií dochází minimálně za 4–8 a 8–16 týdnů na tekutých a pevných půdách (Obrázek 2).

Tabulka 2. Charakteristika nejčastěji využívaných diagnostických

Diagnostická metoda	Výhody metody	Nevýhody metody	Využití metody
Kultivační vyšetření	Zlatý standard (100% specifita) Detekce životaschopných MAP Možnost kvantifikace MAP ve vzorku (CFU)	Dlouhá kultivační doba až 8-12 týdnů Nutnost identifikace izolovaných bakterií Poměrně technicky a finančně náročná	Individuální, směsné vzorky výkalů k detekci MAP vylučujících zvířat Vyšetření vzorků prostředí ke zjištění nákazového stavu stáda
PCR	Rychlá Možnost kvantifikace MAP (počet MAP/g)	Finačně náročná Možná inhibice reakce látkami přítomnými ve výkalech zvířat Nemožnost posoudit životoschopnost MAP	Individuální, směsné vzorky výkalů k detekci MAP vylučujících zvířat Vyšetření vzorků prostředí ke zjištění nákazového stavu stáda Potvrzení vylučování MAP zvířaty s detekovanými Ab
ELISA test	Jednoduché provedení Levný Rychlý	Nižší citlivost pro detekci zvířat v počatečních fázích infekce v porovnání s metodami detekující MAP ve výkalech zvířat	Skríningové vyšetřování zvířat v infikovaném chovu Vyšetření indikované skupiny zvířat, bazénového vzorku mléka ke zjištění nákazového statusu stáda

Legenda: MAP = *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, CFU = jednotka tvořící kolonii



Obrázek 2: Jednotlivé kolonie MAP rostoucí na pevném médiu (Herroldova vaječná půda s mykobaktinem)

Kolonie MAP rostou na pevných půdách jako malé (cca 0,25–1 mm), sférické, průhledné kolonie bez pigmentu s pevným kulatým obvodem a hladkým lesknoucím se povrchem (Obrázek 3). Při delší kultivaci jsou kolonie větší, špinavě bílé až krémové, vystupující nad povrch kultivačního média, dosahující velikosti až 2 mm. K identifikaci izolovaných kolonií se v současnosti nejvíce využívá PCR metoda. Udává se, že specifita (Sp) kultivačního vyšetření spojeného s identifikací MAP pomocí PCR je 99–100 %, proto je tato metoda považována za zlatý standard v diagnostice Johneho choroby. Pokud je citlivost (Se) metody srovnávána s přítomností patologických změn ve střevní sliznici dosahuje hodnoty 60 ± 5 % (Collins et al., 2006). Vyšší je citlivost vyšetření pro detekci zvířat v pozdějších fázích (klinické a pokročilé) infekce. Citlivost kultivačního vyšetření výkalů detekovat klinicky postižená zvířata je vysoká minimálně 75 %, naproti tomu Se pro detekci infikovaných zvířat dosahuje jen 23–29 % (Nielsen & Toft, 2008).

Obrázek 3: Detail kolonií MAP rostoucích na Herroldově vaječné půdě s mykobaktinem

Výhodou kultivačního vyšetření je pomnožení MAP ve vzorcích s jejich nízkou koncentrací. Další výhodou je i možnost kvantifikace mykobaktérií při kultivaci na pevných půdách. Počet MAP je pak vyjádřen počtem jednotek tvořících kolonii (colony forming unit, CFU). Na druhou stranu největší nevýhodou je dlouhá kultivační doba nutná k vyhodnocení výsledku vyšetření.

Kultivační vyšetření se využívá především k individuálnímu vyšetření zvířat s podezřením na paratuberkulózu, vyšetření směsných vzorků (max. od 5-ti zvířat) k dohledání infikovaných zvířat vylučujících MAP v chovech s potvrzenou nákazou nebo k zjištění nákazové situace v chovu vyšetřením směsného vzorku prostředí.

Detekce MAP pomocí PCR/qPCR

Pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) případně kvantitativní PCR (qPCR) je specificky detekována deoxyribonukleová kyselina (DNA) MAP. Úsek DNA vymezený párem primerů, krátkých úseků jednovláknové DNA přisedajících na specifickou sekvenci mykobaktériální DNA, je v reakci násobně amplifikován.

Publikované hodnoty diagnostické specifity a senzitivity jsou různé v závislosti na použité metodice, nicméně dostupné komerční soupravy udávají Sp srovnatelnou a Se stejnou nebo vyšší s kultivačním vyšetřením. Specifitu reakce ovlivňuje lokalizace primerů v genomu MAP a je udávána pro každou PCR. V současné době je v diagnostice hojně využíván IS900 úsek genomu. Jedná se o 1451 páru bází (bp) dlouhou sekvenci, která se v genomu MAP několikrát (15-20) opakuje. Podobné sekvence (IS900-like) byly nalezeny u jiných mykobaktérií, což může vést k falešně pozitivním výsledkům PCR. Proto někteří autoři zvažují využití jiných specifických repetitivních regionů genomu MAP (ISMav2, ISMap02) (Sevilla et al., 2014; Schönenbrucher et al., 2008). Na rozdíl od IS900 se tyto sekvence vyskytují v menším počtu kopií. Nespornou výhodou IS900 regionu tak zůstávají jeho četné kopie v genomu, které zvyšují citlivost reakce. Navíc změna lokalizace primerů v rámci IS900 sekvence může vést k vyšší specifitě reakce (Vansnick et al., 2004). Ke kvantifikaci MAP ve vzorcích je často využíván specifický region F57, který je v genomu MAP přítomen v jedné kopii zajišťující přesnou kvantifikaci MAP.

Citlivost je kromě vlastního nastavení PCR reakce ovlivněna i izolační metodou určující výtěžnost bakteriální DNA ze vzorků (Zhang & Zhang, 2011). Izolace DNA ze vzorků výkalů je ztížená přítomností látek s inhibičním účinkem na průběh následné PCR reakce, které musí být během izolace odstraněny. Případná inhibice PCR reakce by měla být monitorována amplifikací sekundárně přidané DNA do reakce (interní amplifikační kontrola, IAC) souběžně s DNA vzorku. Citlivost PCR reakce by měla být vždy vztažena k dané izolační metodě.

Při využití kvantitativního real-time formátu PCR (qPCR) lze kvantifikovat množství DNA ve vzorku. Pokud je pro danou reakci k dispozici kalibrační křivka, lze stanovit absolutní množství MAP ve vzorku vyjádřením množství kopií DNA vztaženého k 1 gramu vzorku (DNA kopií/g). Relativní množství MAP ve vzorku, lze vyjádřit i hodnotou cyklu (threshold cycle, Ct), ve kterém je detekován PCR produkt daného vzorku. Nižší hodnota Ct odpovídá relativně vyšší koncentraci DNA ve vzorku. Bylo prokázáno, že množství MAP vyjádřeno pomocí Ct koreluje s množstvím MAP zjištěného kultivačním vyšetřením (Aly et al., 2010).

Největší výhodou této vyšetřovací metody je velmi krátký čas (24–48 hodin), který je potřeba k vyhodnocení výsledku oproti kultivačnímu vyšetření. Zdánlivou nevýhodou PCR metody je nemožnost posoudit, zda jsou ve vzorku přítomny živé (infekční) nebo mrtvé MAP.

Detekce MAP ze vzorků výkalů se shodně s kultivačním vyšetřením využívá k diagnostice infekce od klinicky postižených zvířat, k vyšetření směsných vzorků výkalů krav v chovech s potvrzenou nákazou k dohledání infikovaných MAP vylučujících zvířat (max. od 5-ti zvířat) a k průkazu MAP ve vzorcích prostředí k zjištění nákazového stavu v chovu. Navíc se PCR využívá k identifikaci bakteriálních kolonií izolovaných kultivačním vyšetřením.

„Pass-through“ fenomén

Specifita diagnostických metod detekujících MAP ve výkalech zvířat je negativně ovlivněna takzvaným „pass-through“ fenoménem, kdy se ve výkalech neinfikovaných zvířat objevují MAP. K tomuto fenoménu dochází u zvířat, která jsou ustájena v prostředí silně kontaminovaným MAP. Zvířata pak přijímají vysoká množství mykobakterií per os, která pasivně projdou jejich trávicím traktem. K tomuto jevu dochází především v chovech s vyšším výskytem infikovaných zvířat. Lze ho také pozorovat u zvířat z chovů s vazným ustájením, ustájených v těsné blízkosti silně vylučujících jedinců. Avšak i v chovech s tímto fenoménem zůstává odhadovaná specifita kultivačního vyšetření velmi vysoká (98 %) (Nielsen & Toft, 2008).

Mikroskopické vyšetření (barvení dle Ziel-Neelsona)

Inravitálně mohou být vyšetřeny stěrové preparáty připravené z výkalů nemocných zvířat po obarvení dle Ziel-Neelsona. U infikovaných zvířat jsou v mikroskopickém zorném poli patrny shluky malých silně se barvících vínových tyček 0,5–1,5 µm dlouhých. Ke stanovení konečné diagnózy je nutné provést další test k potvrzení identity nalezených tyček. Nevýhodou této metody je nutnost vylučování dostatečného množství MAP výkaly infikovaných zvířat.

4.2 DETEKCE IMUNITNÍ ODPOVĚDI

Mezi testy detekující imunitní odpověď organismu vyvolanou přítomností MAP jsou řazeny sérologické testy k průkazu specifických protilátek a testy detekující aktivaci buněčné složky imunitní odpovědi.

4.2.1 Detekce protilátek

ELISA

ELISA testem jsou detekovány specifické protilátky (Ab) produkované buňkami adaptivní složky imunitního systému. Při diagnostice MAP infekce se využívá detekce Ab v séru a mléku infikovaných zvířat. Výsledek ELISA testu je určen hodnotou S/P, poměrem absorbance vzorku k pozitivní kontrole. Vyšší poměr udává vyšší koncentraci Ab ve vzorku.

V současnosti je využívána celá řada komerčních a nekomerčních souprav se značně rozdílnou udanou hodnotou Se pro detekci infikovaných zvířat (Nielsen & Toft, 2008). Experimentálním srovnáním ELISA testu s přítomností patologických změn ve střevě post mortem byla zjištěno, že u pouhých 30 % zvířat s patologickými změnami ve stěně střeva, lze detekovat Ab v séru (Sweeney et al., 2012). More et al. (2015) na základě publikovaných dat stanovily průměrnou hodnotu Se ELISA testu pro zvířata v různých stádiích infekce. Zvířata byla pro tyto účely rozdělena do tří kategorií: 1. infikovaná (infikovaná zvířata bez klinických příznaků nevylučující MAP, odpovídá latentní fázi infekce), 2. infekční (infikovaná zvířata bez klinických příznaků vylučující MAP, odpovídá subklinické fázi infekce) a 3. postižená (infikovaná zvířata s klinickými příznaky vylučující MAP, odpovídá klinické a pokročilé fázi infekce). Průměrné hodnoty Se pro jednotlivé kategorie dosáhly 15 % pro infikovaná, 47 % pro infekční a 71 % pro postižená zvířata. Porovnáním výsledků ELISA testu z mléka a séra bylo zjištěno, že citlivost detekce Ab v mléce dosahuje 89 % citlivosti testu v séru (More et al., 2015).

Specifita (Sp) testu se udává v rozmezí 91–99 % (průměrná hodnota 98 %) (Smith et al., 2015). Specifita současně používaných ELISA testů je zvýšena pomocí absorpce sér

s *Mycobacterium phlei* (*M. phlei*). Naředění sér pufrem obsahující antigen *M. phlei* vede k vychytání nespecifických křížově reagujících protilátek.

Výhodou ELISA testu je jeho snadné a rychlé provedení a jeho finanční nenáročnost. Nevýhodou je opožděná detekce Ab v počáteční fázi infekce v porovnání s metodami detekujícími MAP ve výkalech.

ELISA test je využívám především v rámci tlumení nákazy ke skríningovému vyšetřování zvířat v infikovaných chovech. Lze ho využít i k individuálnímu vyšetření zvířat s podezřením na paratuberkulózu a vyšetřením indikované skupiny zvířat (starších 36 měsíců) k stanovení nákazového stavu stáda.

Ostatní sérologické testy

Mezi sérologické testy, využitelné k detekci specifických protilátek, patří komplement fixační test a imunodifúzní test v agarovém gelu. Tyto testy byly využívány především pro stanovení diagnózy u klinicky nemocných zvířat. Vzhledem k pracnosti provedení nejsou tyto testy rutině využívány pro detekci infikovaných zvířat.

4.2.2 Detekce buňkami zprostředkované imunity

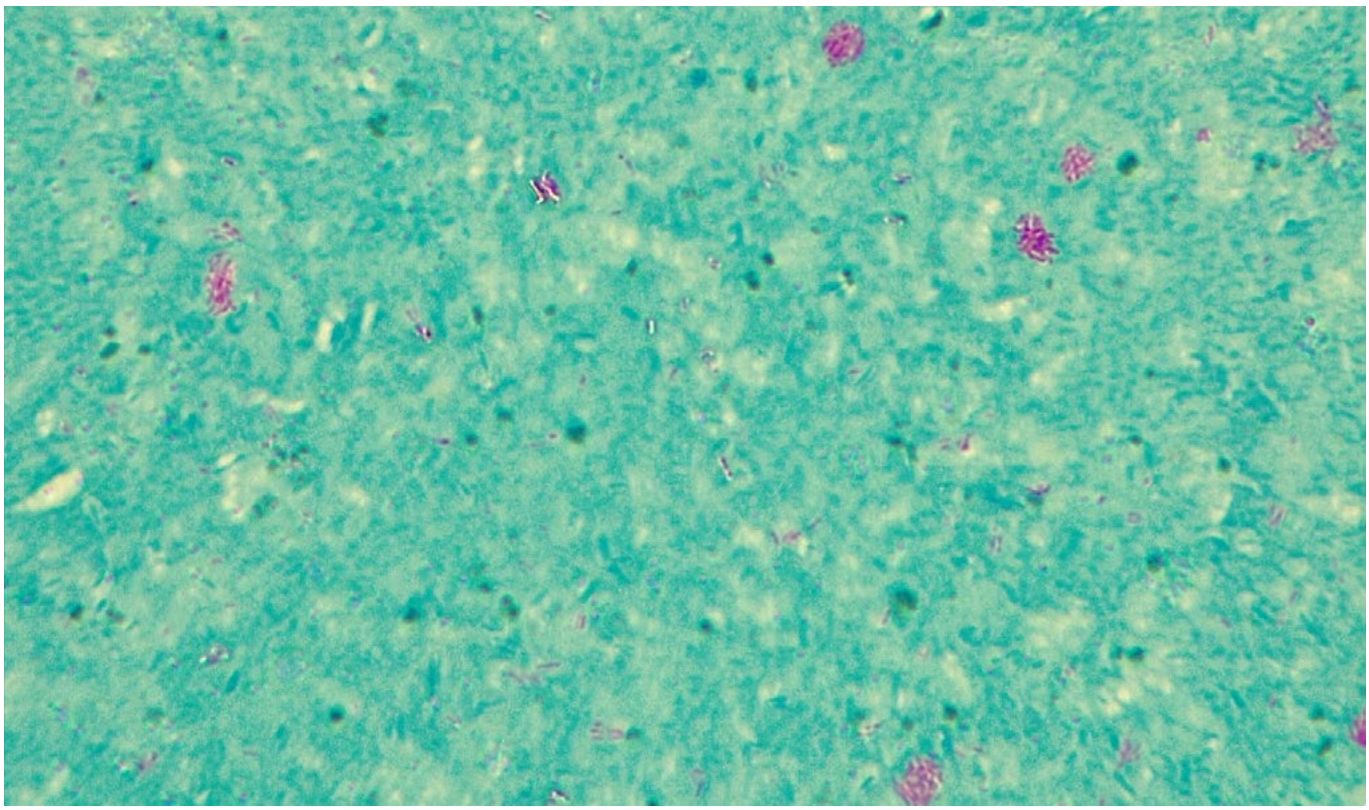
Interferonový test

Principem interferonového testu je detekce produkce interferonu gama (INF-γ) specifickými imunitními buňkami po stimulaci MAP antigenem. Vyprodukovaný INF-γ je následně detekován a kvantifikován pomocí ELISA testu.

Během testu je kultivován nesrážlivý vzorek krve s MAP antigenem. Krev musí být odebrána sterilně a dopravena do laboratoře včas, aby byla zajištěno přežití krevních buněk (vyšetření musí být provedeno ideálně do 8 hod od odběru vzorku). Provedení testu je poměrně náročné na vybavení laboratoře, vyžaduje sterilní prostředí. Specifita testu je ovlivněna použitým antigenem a interpretace výsledků je nejistá, zvláště při použití komplexních antigenů. Interferonový test se rutině k diagnostice MAP nevyužívá.

Detekce hypersenzitivní reakce IV. Typu

Buňkami zprostředkovanou imunitní odpověď lze prokázat kožním testem. Tento test je prováděn intradermální inokulací antigenu (johnin) a měřením ztluštění kůže po uplynutí 72 hodin od inokulace. Vzhledem k všeobecně rozšířené senzibilizaci zvířat mykobaktériemi komplexu *M. avium* a nízké specifitě používaného antigenu není tento test dostatečně specifický a není rutině využíván při diagnostice infikovaných zvířat v chovu.



Obrázek 4: Mikroskopický stěrový preparát mízní uzliny obarvený dle Ziel-Neelsona, MAP jsou viditelné jako vínově zbarvené shluky tyčinek, zvětšeno 10×100

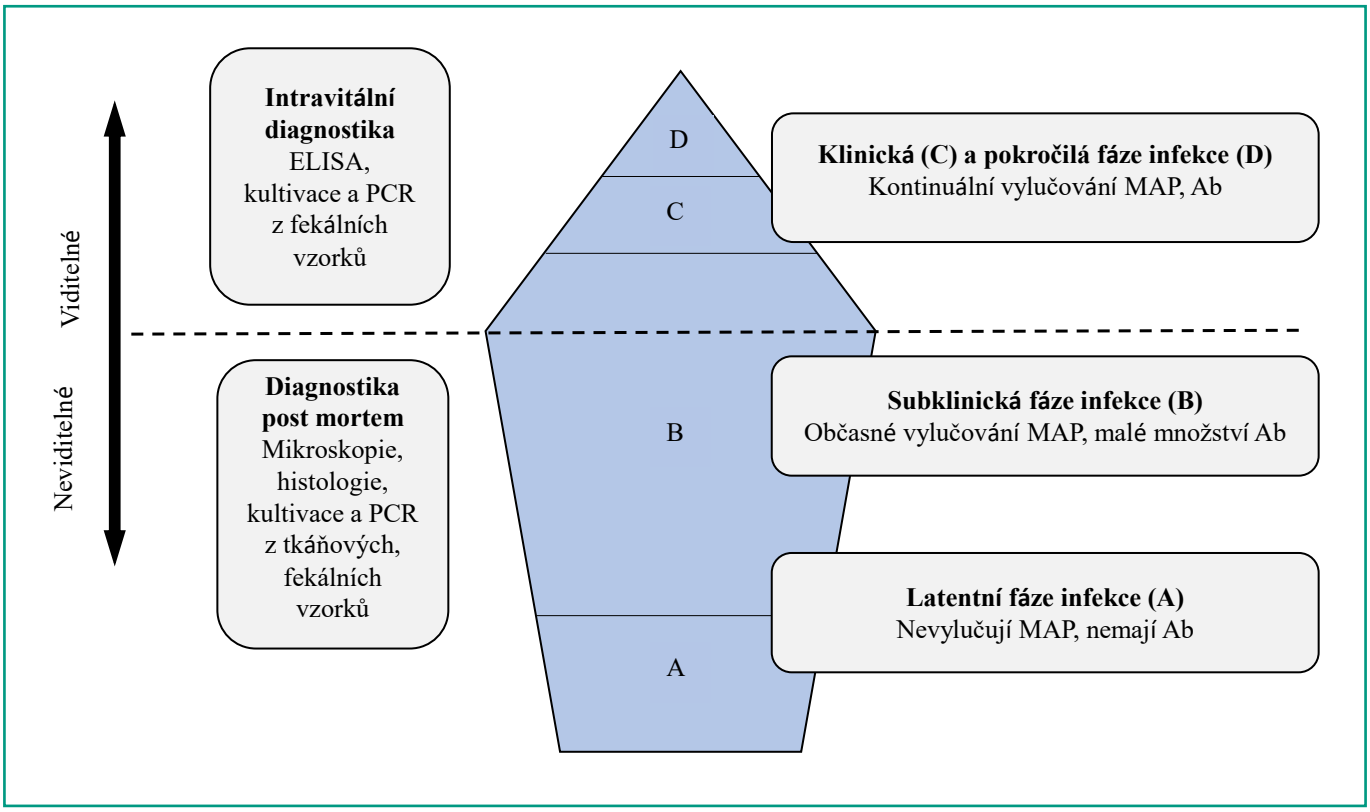
4.3 PATOLOGICKÁ DIAGNOSTIKA

U zvířat, která byla poražena nebo uhynula v důsledku onemocnění, je prováděna pitva a odebrány vzorky tkání k průkazu infekčního agens.

Při pitvě je otevřeno střevo a prohlížena sliznice v celé jeho délce. Patomorfolofické změny jsou typicky umístěny v terminálních úsecích tenkého střeva, v počátečních úsecích tlustého střeva a přilehlých drénujících lymfatických uzlinách. Progrese infekce může ale vyústit až v difúzní poškození v průběhu celého tenkého i tlustého střeva až po rektum. Na postižených úsecích střeva je makroskopicky patrné výrazné ztluštění střevní sliznice s typickým zvrásněným vzhledem v důsledku vystupující podslizniční lymfatické tkáně (gyrifikace střevní sliznice). Mezentriální a ileocekální lymfatické uzliny jsou zvětšené a edématózně prosáklé. Tyto změny jsou typické pro rozvinutou formu onemocnění a jsou provázené celkovou svalovou atrofií až kachexií zvířat. Makroskopické patologické změny v dřívějších stadiích infekce jsou patrné jako ztluštění sliznice nebo zcela chybí. Vážnost klinických příznaků nemusí vždy korelovat s rozsahem intestinálních lézí.

Konečná diagnóza je stanovena až po identifikaci infekčního agens. K průkazu MAP je využíván střevní obsah a vzorky tkání z postižených úseků střeva a mízních uzlin. Při absenci zjevně patrných makroskopických změn jsou odebrány vzorky z ileocekální chlopně (predilekční místo odběru vzorků). Přítomnost MAP v těchto vzorcích je detekována pomocí kultivačního vyšetření, PCR, mikroskopickým nebo histologickým vyšetřením. Mikroskopicky jsou vyšetřovány stěrové a otiskové preparáty postižených tkání, střeva a mízních uzlin (Obrázek 4). Vzorky postižených tkání jsou fixovány a vyšetřeny histologicky. Průkaz MAP v mikroskopických vzorcích je založen na vizualizaci acidorezistentních tyčinek barvením dle Ziel-Neelsona, kdy se MAP v mikroskopickém obrazu jeví jako shluky vínových tyček. Histologicky jsou v postižených tkáních patrné velké makrofágy (epiteloidní buňky) a mnohojaderné gigantické buňky se shluky nebo ojedinělými MAP v cytoplazmě. V pozdějších stádiích jsou v lamina propria postižených úseků střeva a lymfatických uzlinách pozorovány typické granulomatózní léze s MAP. U nemocných jedinců v počátečních fázích infekce jsou pozorovány především fokální léze lokalizované v drénujících mízních uzlinách, v menší míře pak v lamina propria tenkého střeva. V pozdějších fázích infekce se objevují ve sliznici střeva a mízních uzlinách multifokální léze s vysokým počtem MAP. V konečném stádiu je sliznice střeva postižena difúzními lézemi a těžkou granulomatózní enteritidou (Jenvey at al., 2019; Koets et al., 2015).

- Detekce MAP – kultivační vyšetření, PCR/qPCR
- Detekce imunitní odpovědi – ELISA test
- Detetekce MAP ve výkalech předchází detekci Ab v séru
- Patomorfologické změny ve střevě – ztluštění stěny, gyrifikace sliznice
- Mikroskopický průkaz – barvení dle Ziel-Neelsona
- Histologické vyšetření – granulomatózní léze



Obrázek 5: Fenomén ledovce u Johneho choroby (Převzato a upraveno z publikace Magombedze et al. 2013)

4.4 FENOMÉN LEDOVCE

Johneho choroba je chronické onemocnění s velmi dlouho inkubační dobou trvající 2–10 let. Během této inkubační doby dochází u infikovaných zvířat k postupné progresi patologických změn ve střevě, která vyústí ve vylučování MAP výkaly zvířat a v rozvoj klinických příznaků onemocnění. Tato progrese infekce je vyjádřena dříve zmiňovanými fázemi onemocnění (latentní, subklinické, klinické a pokročilé). Současnými rutinně využívanými diagnostickými metodami je detekována přítomnost MAP ve výkalech a specifických protilátek v séru případně mléku. Vylučování MAP výkaly předchází v rozvoji onemocnění výskyt Ab v séru (Magombedze et al., 2017). Infikovaná zvířata začínají vylučovat MAP ke konci subklinické fáze onemocnění, větší množství Ab se v séru objeví v klinické fázi onemocnění.

Z uvedeného vyplývá, že všechna zvířata v latentní a většinu v subklinické fázi infekce, nelze současně využívanými diagnostickými metodami detekovat. Tento stav je popisován jako fenomén ledovce (Magombedze et al., 2013). Všechna infikovaná zvířata v chovu si lze představit jako ledovec s malou částí vystavenou nad hladinu. Hladina v tomto případě představuje hranici vymezující schopnost diagnostických metod detekovat infikovaná zvířata. Všechna zvířata, která není možno detekovat diagnostickými metodami, jsou neviditelná, stejně jako část ledovce pod vodní hladinou. Viditelná, detekovatelná diagnostickými metodami, jsou zvířata od konce subklinické fáze infekce, stejně jako špička ledovce nad hladinou. Vzhledem k pomalé progresi onemocnění vyjádřené inkubační dobou, se virtuálně většina zvířat nachází pod vodní hladinou (Obrázek 5). Mogambodze et al. (2013) dále ve své studii určily poměr zvířat v jednotlivých fázích onemocnění: 1 zvíře v pokročilé fázi infekce: 1–2 zvířata v klinické fázi infekce: 4–8 zvířat v subklinické fázi infekce: menší počet zvířat (<3 zvířata) než součet jedinců s klinickými příznaky (klinická a pokročilá fáze) v latentní fázi infekce. Z uvedeného poměru vyplývá, že nejvíc zvířat v infikovaném chovu je v subklinické fázi infekce a pouze malá část trpí klinickými příznaky.

4.5. KORELACE VÝSLEDKŮ DIAGNOSTICKÝCH METOD A PATOLOGICKÝCH ZMĚN VE STŘEVĚ

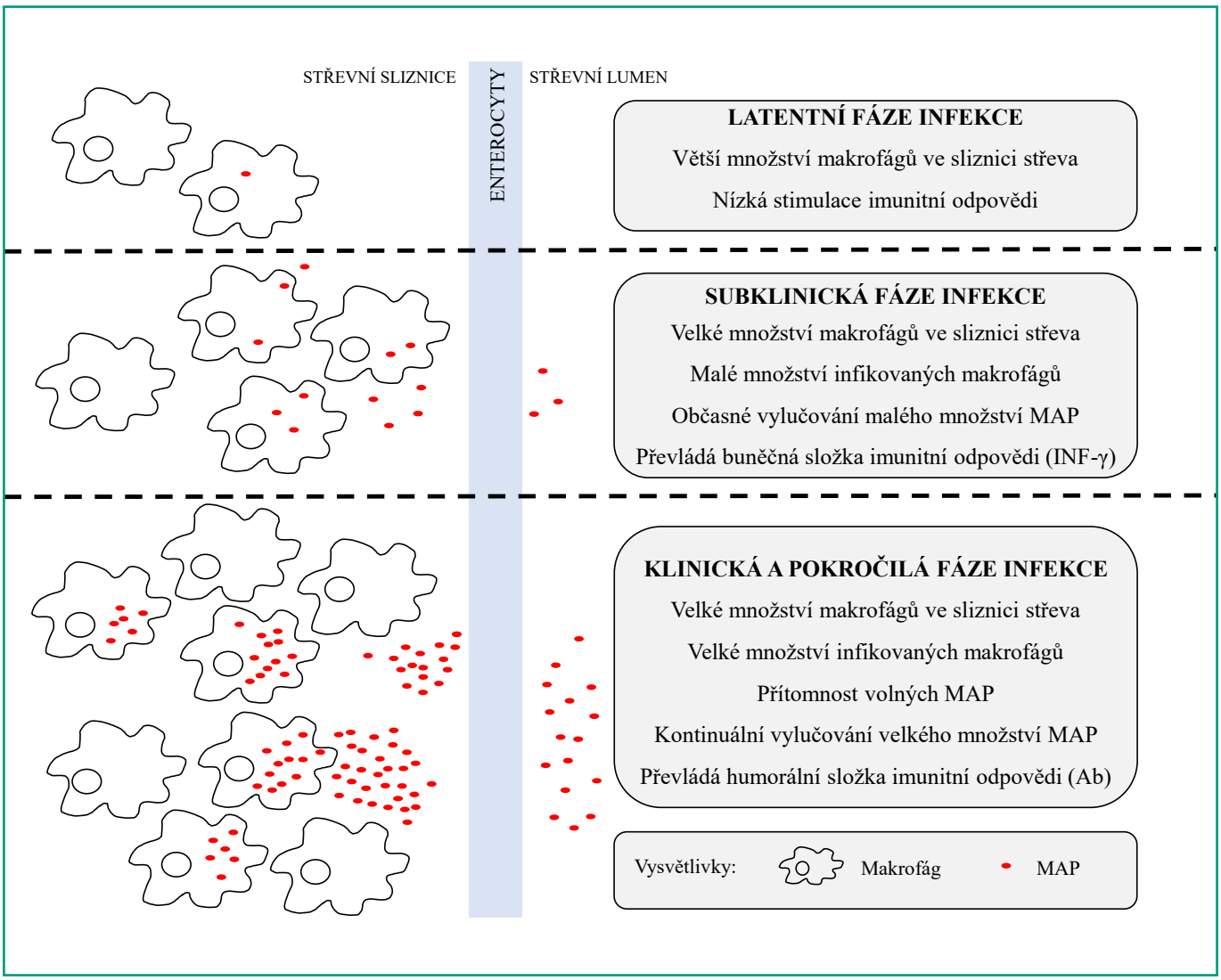
Diagnostické metody slouží k odhalení infikovaných zvířat. Tato zvířata jsou potenciálními šiřiteli nákazy mezi vnímavými zvířaty a jako taková musí být z chovu odstraněna. Jak bylo uvedeno výše diagnostické metody odhalí infikované jedince po uplynutí dlouhé inkubační doby, nebo krátce před tím (subklinická, klinická fáze onemocnění). Progrese onemocnění zvířat v těchto pozdních fázích infekce může vyústit v pokročilou fatální formu onemocnění provázenou progresivním vylučováním velkého množství MAP do okolí. To je spojeno s vysokým rizikem nákazy společně ustájených vnímavých zvířat. V současné době byly publikovány četné studie zabývající se propojením výsledků diagnostických metod s procesy probíhajícími ve střevě, aby bylo možno předvídat rozvoj fatální formy onemocnění. Tyto studie se zaměřily především na korelaci patologických změn ve střevě s rozvojem imunitní odpovědí a vylučováním MAP výkaly (Jenvey et al., 2018; Jenvey et al., 2019; Magombedze et al., 2016; Magombedze et al., 2017).

Za počátek infekce je považován okamžik pohlcení MAP makrofágy. Nejdříve jsou v boji s infekčním agens zapojeny složky vrozené imunity, následně imunitní systém reaguje aktivací adaptivních složek systému (buněčná, humorální/protilátková). Aktivaci buněčné složky imunitního systému lze měřit zvýšenou tvorbou INF-γ v interferonovém testu, humorální složky imunitní odpovědi detekcí Ab ELISA testem. V počátečních fázích infekce jsou střevní makrofágy schopny kontrolovat infekci (latentní fáze onemocnění). S progresí infekce dochází k výraznější aktivaci buněčné složky imunity a ke stimulaci makrofágů pomocí INF-γ. Tyto stimulované makrofágy kontrolují infekci fagocytováním MAP. Množství makrofágů ve střevě je zvyšováno rekrutováním monocytů pocházející z kostní dřeně, které zde dozrají v tkáňové makrofágy.

Postupem času dochází k nahromadění velkého množství makrofágů ve střevní sliznici. MAP uvolněné po rozpadu infikovaných makrofágů jsou fagocytovány. Jejich množství ve tkáních a vylučování do střevního obsahu je minimální. MAP svým působením poškozují fagocytické funkce makrofágů a ovlivňují jejich imunitní odpověď tak, aby byly zajištěny podmínky vhodné pro jejich nekontrolované množení a perzistenci uvnitř makrofágů. Časem dochází k vyčerpání kapacity buněčné složky imunity, zvýšení množství volných MAP ve tkáních a jejich postupnému vylučování do střeva. S tím je spojen počátek tvorby protilátek. Toto stádium onemocnění není provázeno klinickými projevy onemocnění a je charakteristické pro subklinickou fázi onemocnění. Diagnosticky lze pozorovat občasné vylučování MAP a detekovat nízké titry Ab. (Tabulka 1)

Pro další stadium vývoje onemocnění je charakteristické velké množství infikovaných makrofágů s vysokým počtem MAP jak uvnitř makrofágů, tak volných v tkáních. Pravděpodobně přítomnost většího množství volných MAP vychýlí imunitní reakci ve prospěch humorální složky imunitní odpovědi vyjádřenou tvorbou protilátek. Tyto protilátky však nemají protektivní účinek (nepodílí se na likvidaci volných MAP ani infikovaných makrofágů). V tomto stádiu je výrazně poškozena absorpční schopnost střeva a dochází ke klinickým projevům onemocnění. Zvířata kontinuálně vylučují vysoká množství MAP ve výkalech, souběžně s tím jsou detekovány vyšší titry protilátek. (Tabulka 1)

Z uvedeného vyplývá, že stimulace buněčné složky imunitního systému společně s absencí vylučování detekovatelného množství MAP ve výkalech predikuje zvířata v latentní fázi onemocnění. Přítomnost zvýšeného množství makrofágů ve sliznici střeva s vyváženým vyjádřením buněčné a humorální složky imunitní odpovědi a občasným vylučováním MAP charakterizuje subklinickou fázi infekce. Klinickou fázi onemocnění pak charakterizuje kromě vysokého množství infikovaných makrofágů vysoký titr Ab a vylučování velkého počtu MAP ve výkalech. Přičemž vysoké množství MAP ve výkalech predikuje přítomnost granulomatózních změn ve střevě. Schématicky jsou změny ve střevě v jednotlivých fázích infekce znázorněny na Obrázku 6.



Obrázek 6: Schématické znázornění změn ve sliznici střeva v jednotlivých fázích infekce

Z běžně využívaných diagnostických metod progrese onemocnění koreluje se zvyšujícím se titrem protilátek a rostoucím počtem vylučovaných MAP (Schukken et al., 2015). U zvířat s progresivní formou onemocnění byl pozorován lineární nárůst množství protilátek provázený zvyšujícím se množství MAP ve výkalech. U zvířat s neprogresivní formou onemocnění byla výše titru protilátek nízká. Vysoký titr protilátek a vysoké množství vylučovaných MAP ve výkalech tak predikuje klinickou, rozvinutou formu onemocnění končící úhynem zvířete.

- Progrese onemocnění koreluje s rostoucím počtem vylučovaných MAP
- Progrese onemocnění koreluje se zvyšujícím se množstvím Ab
- Zvířata mající velké množství Ab s vysokou pravděpodobností vylučují MAP

5. TLUMENÍ NÁKAZY

Paratuberkulóza je celosvětově rozšířena v populaci skotu a v mnoha zemích se vyskytuje endemicky (Geraghy et al., 2014). Paratuberkulóza negativně ovlivňuje produkci a welfare zvířat a představuje potenciální riziko zdravotních poruch u lidí. Proto bylo v mnoha zemích přistoupeno k tlumení této nákazy zaváděním kontrolních programů. Úroveň kontroly v jednotlivých zemím se různí od regionálních programů po celostátní programy na povinné nebo dobrovolné bázi (Fanelli et al., 2020).

5.1 DŮVODY TLUMENÍ NÁKAZY

Ekonomické ztráty v infikovaném chovu

Z pohledu chovatele jsou hlavním důvodem tlumení nákazy MAP v chovech dojeného skotu ekonomické ztráty. Ekonomické ztráty v infikovaném chovu závisí na počtu infikovaných zvířat a na fázi progrese onemocnění. Vzhledem k obtížnostem spojených s diagnostikou infikovaných zvířat a tím přesným určením jejich prevalence v chovu je velice obtížné vyčíslení těchto ztrát. Je však zřejmé, že tyto ztráty mohou být značné, jak ve své studii shrnuli Garcia & Shallo (2015).

> Nejvýrazněji jsou ekonomické ztráty vyjádřeny v chovech s vyšší prevalencí infekce, s větším počtem infikovaných zvířat v pozdních fázích infekce. Ekonomické ztráty bývají chovateli většinou spojovány se zvířaty s viditelnými klinickými příznaky, ale i zvířata v subklinické fázi vykazují poruchy zdraví a reprodukce (Garcia & Shaloo, 2015). Infekce způsobuje v postiženém chovu ztráty v důsledku snížené produkce, předčasné brakace, zvýšené mortality, zvýšených nákladů na nákup nových zvířat. Dalším faktorem negativně ovlivňující ekonomiku chovu jsou výdaje nutné na testování zvířat a ztráty způsobené zaváděním kontrolních opatření (porážka infikovaných zvířat) v infikovaných chovech.

Infekce MAP negativně ovlivňuje přímo produkci i kvalitu mléka (Whittington et al., 2019). Podle Ozsvari et al. (2020) sérologicky pozitivní krávy vyprodukuji za laktaci v porovnání s nádojem mléka ELISA negativních krav o 9,4 % méně mléka, které má o 35,8 % vyšší počet somatických buněk. S vyšší paritou zvířat rostou i ztráty v produkci mléka (Ozsvari et al., 2020; Wiszniewska-Łaszczych et al., 2020). U krav na první laktaci nebývá pozorován výraznější negativní vliv infekce na množství nadojeného mléka (Aly et al., 2009). Poměrné snížení produkce mléka a vyšší počet somatických buněk v mléce je ovlivněno fází infekce, s progresí infekce ze subklinické do klinické fáze rostou i ztráty v produkci mléka a počet somatických buněk. Výraznější ztráty v produkci mléka jsou i v chovech s vyšší prevalencí infekce (McAloon et al., 2016). Kvalita a množství mléka je navíc ovlivněna vyšší incidencí klinických mastitid u ELISA pozitivních krav. Nepřímo je rentabilita produkce mléka ovlivněna i delším mezidobím a snížením procenta

zabřezávání infikovaných krav. Sérologicky pozitivní krávy zabřeznou v průměru o měsíc později oproti společně ustájeným sérologicky negativním kravám.

Snížená konverze krmiva v důsledku postižení střevní sliznice infekcí MAP vede k nižším přírůstkům na váze odchovávaných telat a jalovic a snížené porodní hmotnosti telat narozeným infikovaným kravám. Vyřazená infikovaná zvířata mívají horší výživný stav a tím i nižší jatečná hodnotu. Navíc klinicky postižená těla jatečných zvířat nemohou být zpracována pro lidskou spotřebu. Mimo to jsou infikovaná zvířata více náchylná k jiným onemocněním, což se projeví vyšší nemocností. Zhoršené prospívání a vyšší nemocnost infikovaných zvířat vede k předčasné brakaci nebo úhynu těchto zvířat. Zvýšená brakace a úhyn vedou k snížení počtu krav v chovu a nutí chovatele nakupovat nová chovná zvířata.

- Snížená produkce mléka
- Poruchy reprodukce (snížení procenta zabřezávání, prodloužení mezidobí)
- Snížená konverze krmiva (snížená jatečná hodnota zvířat)
- Neprospívání a vyšší nemocnost zvířat
- Předčasná brakace a úhyn infikovaných zvířat

Zdravotní rizika u lidí vyvolaná MAP

V současnosti je hojně diskutována role MAP v rozvoji zdravotní poruch lidí. Do lidské populace může být MAP zanesena kontaminovanou vodou (fekální znečištění povrchových vod), potravinami pocházejícími z infikovaných zvířat (mléko, nehygienicky opracované jatečné maso) případně přímým kontaktem ošetřovatelů s infikovanými zvířaty. V syrovém i pasterizovaném mléku byly detekovány živé MAP (Ruzante et al., 2008). U lidí je MAP zvažována jako jedna z příčin polyfaktoriálních onemocnění na jejichž etiologii se podílí abnormální funkce imunitního systému. Jedná se především o idiopatická zánětlivá onemocněním střev (Crohnova choroba, ulcerózní kolitida) ale i jiná onemocnění (cukrovka 1. typu, revmatoidní artritida, roztroušená skleróza atd.) (Garvey, 2018). Nejčastěji je však MAP zmiňována jako jeden z faktorů vzniku Crohnovy choroby, kdy imunitní systém reaguje nadměrnou reakcí na přítomnost infekčního agens.

5.2 DIAGNOSTICKÉ METODY VYUŽÍVANÉ PŘI TLUMENÍ NÁKAZY V CHOVU

Během tlumení nákazy v chovu se využívají různé diagnostické testy. Výběr konkrétní diagnostické metody je ovlivněn důvodem, pro které je vyšetření prováděno. Odebrané vzorky se vyšetřují individuálně nebo ve směsi. Diagnostické testy se využívají zejména pro odhalení nákazového statusu stáda, k dohledání infikovaných zvířat v infikovaných chovech a k dohledu nad chovy bez infekce nebo s nízkým rizikem infekce. Dále by měla být vyšetřena všechna zvířata před zařazením do chovu. U klinicky nemocných zvířat suspektně infikovaných MAP se provádí vyšetření k potvrzení diagnózy. U neinfikovaných chovů/chovů bez prokázané nákazy se provádí pravidelná monitorování k potvrzení statusu chovu bez infekce.

5.2.1 Stanovení diagnózy u klinicky nemocných zvířat

K stanovení diagnózy u zvířat s klinickými příznaky suspektními pro paratuberkulózu se provádí sérologické vyšetření nebo průkaz MAP ve vzorcích výkalů kultivačním vyšetřením nebo pomocí PCR. U uhynulých zvířat nebo zvířat odeslaných na porážku se provádí mikroskopické vyšetření tkáňových stěrů případně histologické vyšetření postižených tkání. V chovech s neznámou nákazovou situací je vhodné k potvrzení přítomnosti infekčního agens provést kultivační vyšetření.

5.2.2. Stanovení infekčního statusu stáda, identifikace infikovaného chovu, prevalence infikovaných chovů

K stanovení infekčního statusu stáda lze využít vyšetření směsných nebo individuální vzorků ELISA testem pro detekci Ab, nebo kultivačního vyšetření a PCR pro identifikaci MAP. Jednotlivé diagnostické postupy mají různou citlivost pro detekci infikovaných chovů a jejich doporučené použití závisí na předpokládané prevalenci infekce v chovu. Výběr strategie určení infekčního statusu stáda záleží na cílech stanovených chovatelem, nebo jsou určeny v rámci kontrolního/certifikačního programu aplikovaného v chovu (Geraghty et al., 2014).

Vyšetření bazénového vzorku mléka

Vyšetření bazénového vzorku mléka (BVM) je často využíváno při monitorování a tlumení infekčních chorob. Při tomto vyšetření se využívá výhody vyplývající z vyšetření velké skupiny zvířat v jediném vzorku.

V BVM lze detekovat Ab ELISA testem nebo prokázat přítomnost MAP pomocí PCR. Beaver et al. (2016) prokázali spojitost mezi detekcí Ab a MAP v mléce. Pozitivní nález MAP pomocí PCR byl spojen s vyšším titrem Ab v BVM. I přes tuto spojitost u většiny vyšetřovaných chovů s vysokým titrem protilátek nebyla prokázána přítomnost MAP v BVM. MAP jsou do mléka vylučovány přímo infikovanými zvířaty nebo je jejich přítomnost v mléce důsledkem kontaminace během dojení. Současný průkaz Ab v BVM bez detekce MAP může být důsledkem malého počtu krav vylučujících MAP do mléka v infikovaných chovech nebo vysokého hygienického standardu během dojení vedoucí k minimální kontaminaci mléka.

Kontaminace mléka v průběhu dojení byla odhalena autory Serraino et al. (2014). V jejich studii byly vyšetřovány BVM ELISA testem současně s mléčnými filtry PCR testem. I když bylo více infikovaných chovů detekováno pomocí pozitivního nálezu MAP v mléčných filtrech, výsledky PCR vyšetření nekorelovaly s množstvím sérologicky pozitivních zvířat detekovaných ve vyšetřovaných chovech. MAP byla detekována se stejnou frekvencí v chovech s nízkou i vysokou prevalencí infekce.

Výsledky detekce MAP v mléku jsou nestandartní: existence chovů s vysokou prevalencí infekce bez průkazu MAP v BVM zároveň s chovy s nízkou prevalencí infekce a přítomností MAP v mléku. Tyto výsledky naznačují, že přítomnost MAP v mléce je spíše odrazem hygienických podmínek během dojení, něž vylučování MAP do mléka infikovanými zvířaty. To společně s poměrně náročným zpracováním vzorků (BVM, mléčné filtry) před vlastním PCR vyšetřením (Beaver et al., 2016; Serraino et al., 2014) hendikepuje tuto metodu pro využití k stanovení infekčního stavu stáda.

K odhalení infekčního stavu stáda pomocí vyšetření BVM se tak využívá především detekce Ab ELISA testem. Množství Ab v bazénovém vzorku mléka je ovlivněno počtem zvířat vylučujících Ab do mléka a množstvím Ab vylučované jednotlivými zvířaty. Opakované vyšetření BVM vykazovalo konstantní hodnoty množství Ab (Nielsen & Toft, 2014). Navíc bylo zjištěno, že množství Ab v BVM koreluje s prevalencí infekce mezi dojnicemi. Chovy s pozitivním výsledkem detekce Ab v BVM mají zřetelně vyšší prevalenci zvířat s prokazatelným titrem Ab než chovy negativní (Nielsen & Toft, 2014; Serraino et al., 2014). S vyšší prevalencí infekce mezi kravami se zvyšuje pravděpodobnost detekce Ab v bazénovém vzorku mléka, nicméně prevalence Ab pozitivních zvířat v chovu je nízká, mnoho infikovaných jedinců nemá protilátky. Obecně se uvádí, že využití detekce Ab v BVM pro určení infekčního statusu stáda není vhodný pro chovy s nízkou prevalencí infekce (Lavers et al., 2014).

Pesqueira et al. (2017) ve své studii uvádí citlivost (Se) ELISA testů při vyšetření BVM detekovat chovy se séroprevalencí ≥10 % v rozmezí 71,4–85,7 %, v závislosti na použitém testu. Hodnota Se klesla na 36,8–43,9 % pro chovy s nižší prevalencí infekce (v rozmezí od >0 do <10 %). Specifita (Sp) těchto ELISA testů byla v rozmezí 53-70,5 %.

Jíní autoři uvádí citlivost při vyšetření BVM ELISA testem 53 % pro detekci chovů s prevalencí infekce vyšší než 9 % a průměrnou hodnotu Se detekovat infikované chovy 16 % (Delafosse et al., 2019). Pro zvýšení citlivosti ELISA testu detekovat infikované chovy byla v této studii autory stanovena optimalizovaná hranice pozitivity pro BVM (nižší hodnota S/P pro pozitivní výsledek oproti hodnotě uvedené výrobcem neovlivňující Sp testu). Využitím takto upravené hranice pozitivity vzorku vzrostla Se testu detekovat chovy s prevalencí nad 9 % na 75 % a detekovat infikované chovy na 53 %.

Citlivost detekce infikovaných chovů lze zvýšit vyšším počtem vyšetřených vzorků, kterého lze dosáhnout opakovaným vyšetření nebo souběžným vyšetřením různých vzorků. Serraino et al. (2014) opakovaně v půlročním intervalu vyšetřovali BVM a mléčné filtry. Citlivost tohoto postupu byla 56 % pro chovy s nízkou prevalencí infekce (>2 %) a 100 %

pro chovy s prevalencí >8 %. Opakované vyšetření navíc vedlo k odhalení vyššího počtu chovů s pozitivním výsledkem alespoň v jednom vyšetření. Vyšší citlivost detekovat infikované chovy souběžným vyšetřením dvou vzorků byla prokázána i ve studii autorů Delafosse et al. (2019), kteří vyšetřovali BVM ELISA testem a vzorek prostředí pomocí qPCR. Celková Se detekovat infikované chovy vzrostla z 53 % a 72 % stanovené pro vyšetření jednotlivými metodami, ELISA testem a qPCR, na 80 % při využití výsledků vyšetření oběma metodami. Nejvyšší citlivost 97 % byla prokázána pro chovy s prevalencí infekce nad 9 %. Nejvýrazněji byla souběžným vyšetřením dvou vzorků ovlivněna citlivost metody pro detekci chovů s nízkou prevalencí infekce okolo 3 %.

Vyšetření BVM ELISA testem lze využít pro detekci chovů s vyšší prevalencí infekce. Citlivost vyšetření je nejvyšší pro chovy s prevalencí infekce okolo 10 % a vyšší. Negativní výsledek vyšetření mají neinfikované chovy i chovy s nižší prevalencí infekce. Vyšetření BVM nelze využít k identifikaci neinfikovaných chovů.

Vyšetření směsných vzorků prostředí

Vyšetření směsných vzorků prostředí (SVP) je levná efektivní metoda pro testování infekčního statusu stáda. Infikovaná zvířata vylučují MAP výkaly, ty jsou následně součástí chlévské mrvy nebo kejdy ležící na podlahách stájí. Detekce MAP ve vzorku prostředí je ovlivněn vlastní metodikou odběru a vyšetření vzorku (lokalitou odběru vzorku, kategorií zvířat z jejichž prostředí je vzorek odebírán, typem ustájení, počtem odebraných vzorků, použitou metodou vyšetření), prevalencí krav vylučujících MAP a počtem MAP těmito zvířaty vylučovaným.

Vzorky prostředí pocházejí v zásadě ze dvou typů lokalit: stájové prostředí zvířat a úložiště chlévské mrvy/kejdy. Stájové vzorky prostředí jsou odebírány z prostor hnojných chodeb produkčních stájí, chodeb využívaných pro transport krav na dojírnu, z čekárny před dojírnou, z porodny, z prostoru s ustájenými nemocnými nebo suchostojnými zvířaty. V zásadě se jedná o prostory s chlévskou mrvou/kejdou pocházející od různých kategorií zvířat: dojnice, nemocné krávy, suchostojné krávy a krávy v porodním a poporodním období. Doporučený počet odebraných vzorků z jednoho chovu kolísá v rozmezí od dvou do šesti. Přítomnost MAP ve vzorcích je prokazována pomocí kultivačního vyšetření nebo PCR.

Využitelnost SVP k detekci infikovaných chovů byla prokázána pomocí současného vyšetření vzorku prostředí a individuálních vzorků zvířat ustájených ve sledovaných chovech. Počet infikovaných chovů dle vyšetření SVP koreloval s počtem chovů, ve kterých byla infekce prokázána pomocí vyšetření části zvířat individuálně kultivačním vyšetřením výkalů nebo sér ELISA testem (Berghaus et al., 2006). Ve vzorcích prostředí byla MAP detekována v 70 % chovů s ustájenými zvířaty vylučujícími MAP (Lombard et al., 2006). Individuálním vyšetřením vzorků výkalů bylo navíc zjištěno, že výsledky vyšetření vzorků pocházejících z prostor produkčních stájí obývané dojnicemi a z úložiště mrvy koreluje s prevalencí krav vylučujících MAP (Pilars et al., 2009; Raizman et al., 2004). Tyto dvě lokality jsou uváděny jako nejvhodnějším místem odběru SVP pro detekci infikovaných chovů (Corbet et al., 2018; Lavers et al., 2013).

Hnojiště jsou vzhledem k jejich umístění mimo prostory stájí vystavena povětrnostním vlivům ovlivňujícím přežívání MAP a tím jejich průkaz kultivačním vyšetřením, a to především v chladných zimních měsících (Wolf et al., 2015). V současnosti bývá chlévská kejda často využívána pro výrobu elektrické energie a tepla v bioplynových stanicích, což znesnadňuje její odběr. Vyloučením vzorků pocházejících z úložiště hnoje nevedlo k poklesu citlivosti detekce MAP ve SVP (Donat et al., 2015). Vzorky z produkčních stájí zahrnují výkaly většiny krav v chovu (mimo suchostojné a nemocné krávy). Navíc vzhledem k dlouhé inkubační době předcházející vylučování MAP výkaly infikovaných jedinců odběr vzorků od starších zvířat zvyšuje pravděpodobnost záchytu MAP ve vzorku. V rámci prostor stájí se jako nejhodnější jeví prostory chodeb (Donat et al., 2015; Fichtelová et al., 2021b; Smith et al., 2011,

Obrázek 7: Přístupová chodba k dojírně s homogenizovaným fekálním materiálem na podlaze, místo odběru směsného vzorku prostředí

Wolf et al., 2015). Zde je chlévská mrva promísena pohybem zvířat a minimálně kontaminovaná podestýlkou, jejíž přítomnost snižuje pravděpodobnost detekce MAP (Corbet et al., 2018; Wolf et al., 2015).

Lavers et al. (2013) ve své studii detekovali 71 % infikovaných chovů pomocí vyšetření šesti SVP pocházejících z produkčních stájí, úložiště mrvy a prostor z porodních boxů případně prostor s ustájenými nemocnými jedinci. Počet SVP, ve kterých byla detekována MAP, rostl společně s prevalencí krav vylučujících MAP a současně byla MAP nejčastěji detekována ve vzorcích odebraných z úložiště hnoje a chodeb produkčních stájí. Tito autoři dále uvádějí Se 100 % pro detekci chovů s prevalencí MAP vylučujících zvířat ≥8 % a 90 % pro chovy s prevalencí 5 %.

Detekce MAP ve vzorcích prostředí závisí kromě lokality odběru a prevalenci MAP vylučujících zvířat i na množství MAP těmito zvířaty vylučovaným, jak bylo publikováno autory Smith et al. (2011), kteří ve své studii zjistili citlivost vyšetření SVP pro detekci infikovaných chovů s 5-ti procentní prevalencí zvířat vylučujících MAP pouze 40 %. Vyšší množství MAP vylučovaných infikovanými jedinci zvyšuje pravděpodobnost detekce MAP ve SVP i v chovech s nižší prevalencí MAP vylučujících zvířat a naopak. Tento vliv množství vylučovaných MAP na detekci infikovaných chovů pomocí vyšetření SVP se projeví nejvíce právě u chovů s nižší prevalencí infekce (≤5 %). Přítomnost jedné či více super vylučovatelek (krav vylučujících více jak 10^4 CFU v gramu výkalů, viz kapitola 5.3.3) vede k detekci MAP ve SVP i v chovech s nižší prevalencí infekce (~2 %) (Fichtelová et al., 2021c).

Určení citlivosti metody vyšetření SVP vzhledem k prevalenci infekce v chovu závisí na metodě využité pro určení prevalence infekce v chovu. Nejpřesnější je individuální vyšetření vzorků výkalů. To ve své studii využili Donat et al. (2015), kteří stanovili hranici 2,9 % a 6,2 % zvířat vylučujících MAP při současném vyšetření 3 vzorků prostředí (chodby a podlahy produkční stáje, čekárna před dojírnou) souběžně kultivačním vyšetřením a metodou qPCR pro detekci infikovaných chovů s 50 % a 90 % pravděpodobností. Opakovaným vyšetřením SVP bylo dosaženo zvýšení pravděpodobnosti detekce chovů s nižší prevalencí infekce. Vyšetření SVP pro identifikaci infikovaných chovů tak není vhodné pro chovy s velmi nízkou prevalencí infekce (Donat et al., 2015; Smith et al., 2011). Na druhou stranu opakovaný negativní výsledek vyšetření SVP zvyšuje pravděpodobnost, že se jedná o chov s nízkou prevalencí infekce (≤2 %) (Lavers et al., 2013).

Počet vzorků prostředí vyšetřovaný jednotlivými autory kolísá v rozmezí od 2 do 6 vzorků. Nejčastěji bylo k detekci MAP využíváno kultivační vyšetření. Současným vyšetřením vzorků prostředí kultivací a PCR byla MAP prokázána ve větším počtu vzorků pomocí PCR oproti kultivačnímu vyšetření (Donat et al., 2015; Ramovic et al., 2020). Velkou výhodou vyšetření SVP pomocí qPCR

je rychlost vyšetření, která je zvlášť podstatná pro brzké zavedení kontrolních opatření v infikovaných chovech. Kromě dlouhé doby nutné k vyhodnocení výsledků kultivačního vyšetření SVP je toto ztíženo i nárůstem kontaminující mikroflóry (Donat et al., 2015; Fichtelová et al., 2021b).

Bylo prokázáno, že jednorázové vyšetření 3 vzorků prostředí je dostatečné k určení infekčního statusu stáda (Donat et al., 2015). Výsledky vyšetření SVP pomocí qPCR pocházejících z přístupových chodeb na dojírnu, hnojných chodeb a prostoru čekárny před dojírnou koreloval v 84,2 %; 73,7 % a 63,2 % s určením infekčního statusu stáda určeným souběžným vyšetřením SVP kultivací a qPCR (Fichtelová et al., 2021b). Pravděpodobnost detekce infikovaného chovu, lze zvýšit opakovaným vyšetřením. Navíc opakované vyšetření vede za využití qPCR metody ke snížení hranice prevalence MAP vylučujících zvířat nutné pro detekci MAP ve SVP oproti jednorázovému vyšetření (Donat et al., 2015). Vyšetření SVP pomocí qPCR je tak vhodným nástrojem pro určení infekčního statusu stáda.

Vyšetření individuálních vzorků

Vyšetření vzorků odebraných od jednotlivých zvířat se využívá pro stanovení infekčního statusu u chovů s předpokládanou velmi nízkou prevalencí infekce. K tomuto účelu se využívá detekce Ab v mléku, séru nebo průkaz MAP ve výkalech kultivačním vyšetřením nebo metodou PCR. Vzorky mohou být vyšetřeny individuálně nebo ve směsi. Směsné vzorky se využívají především při vyšetřování výkalů, kdy v jedné směsi jsou obsaženy vzorky maximálně od pěti jedinců. Vyšetřena mohou být všechna zvířata v chovu, náhodně vybraná statisticky významná část zvířat nebo cíleně vybraná skupina zvířat. Vyšetření všech zvířat se využívá především v malých chovech, nebo tam kde je vhodné znát prevalenci infekce v chovu. Cílený výběr zvířat zahrnuje zvířata u nichž je podezření na infekci vzhledem ke klinickým projevům onemocnění, horšímu výživovému stavu, zhoršení chovných a produkčních ukazatelů, nebo na základě věku zvířat. Nejčastěji jsou vyšetřovány krávy ve věku 24–36 měsíců a starší ELISA testem, u nichž je vyšší pravděpodobnost detekce Ab (Kirkeby et al., 2015).

- Vyšetření bazénových vzorků mléka detekuje chovy s prevalencí infekce ⩾10 %
- Vyšetření vzorků prostředí detekuje chovy s prevalencí infekce ~6 %
- Individuální vzorky od zvířat vyšetřených individuálně nebo ve směsi lze využít k detekci chovů s nízkou prevalencí

5.2.3 Dohledání infikovaných zvířat v chovech

K dohledání infikovaných zvířat v infikovaném chovu lze využít individuálních vzorků sér, mléka k detekci Ab ELISA testem a vzorků výkalů k detekci MAP pomocí kultivačního nebo PCR vyšetření. Výběr diagnostické metody je ovlivněn Se a Sp metody detekovat požadovanou skupinu zvířat (Tabulka 3) zároveň s výší finančních nákladů spojených s daným vyšetřením. Terčem tlumení MAP v chovu je infekční zvíře vylučující MAP. Metodou volby pro detekci MAP ve výkalech je kultivační případně PCR vyšetření. Obě tato vyšetření jsou poměrně finančně náročná, navíc kultivační vyšetření vyžaduje dlouhou dobu několika měsíců pro získání výsledku, což obě metody hendikepuji pro rutinní využití při tlumení infekce. Naproti tomu využití ELISA testu nahrává jednoduchost jeho provedení, krátký čas nutný k vyhodnocení výsledku a v neposlední řadě i jeho poměrná finanční nenáročnost.

V porovnání s detekcí MAP ve výkalech může být průkaz Ab u infikovaných zvířat opožděn až o sedm měsíců (Yamamoto et al., 2018), což může ovlivnit efektivitu tlumení infekce. Ve studiích zabývajících se vzájemným vztahem výsledku vyšetření získaných různými diagnostickými metodami, bylo prokázáno, že zvířata s prokazatelným množství Ab v séru nebo mléku s vysokou pravděpodobností vylučují MAP výkaly. U těchto zvířat lze navíc předpokládat progresivní nárůst počtu vylučovaných MAP (Espejo et al., 2015; Yamamoto et al., 2018). Dalším studiem vztahu mezi detekcí MAP ve výkalech a průkazem Ab bylo zjištěno, že množství MAP ve výkalech predikuje výši hodnoty S/P ELISA testu. Vyšší S/P ELISA testu souvisí s větším množstvím MAP vylučovaného výkaly. Vylučování velkého množství MAP bylo provázeno s dvou měsíční prodlevou průkazem Ab s vysokou hodnotou S/P v ELISA testu (Beaver et al., 2017).

Tabulka 3: Senzitivita (Se) a specifita (Sp) diagnostických metod

	Kultivace	PCR	ELISA
Citlivost testu (Se)			
Krávy vylučující ≥50 CFU/g	0,9 (0,75-1)	0,84 (0,77-0,9)	0,78 (0,67-0,86)
Krávy vylučující ≤50 CFU/g	0,5 (0,25-0,75)	0,47 (0,41-0,54)	0,24 (0,19-0,30)
Specifita testu (Sp)			
	0,98 (0,92-1)	0,94 (0,87-1)	0,97 (0,91-0,99)

Legenda: CFU = jednotka tvořící kolonii (colony forming unit)
Údaje převzaty z publikace Smith et al., (2015)

Konkrétní využití diagnostických metod k dohledání infikovaných zvířat bývá součástí strategie tlumení infekce zavedené v jednotlivých infikovaných chovech. V zemích, ve kterých jsou uplatňovány kontrolní programy, je k dohledání infikovaných zvířat hojně využíván ELISA test (Geraghty et al., 2014). Z výše uvedeného je patrné, že ELISA test identifikuje infikovaná zvířata vylučující MAP. Navíc časová prodleva mezi začátkem vylučování MAP a detekcí Ab u infikovaných zvířat je s ohledem na nejčastěji využívanou praxi vyšetřování zvířat v ročních intervalech zanedbatelná.

5.2.4. Potvrzení statusu neinfikovaného stáda

K tomuto účelu jsou vyšetřována všechna zvířata v chovu starší 24–36 měsíců. Vyšetření se provádí kontinuálně v pravidelných intervalech. V případě chovu bez detekovaných infikovaných jedinců zvyšuje opakované vyšetření pravděpodobnost, že chov není skutečně infikován. Pokud nebyli v chovu detekování žádní infikovaní jedinci během čtyřletého období pravidelného ročního vyšetřování sér ELISA testem všech dvouletých a starších krav v chovu, lze chov považovat s 90 % pravděpodobností za neinfikovaný. Po sedmi letech se tato pravděpodobnost zvýší na 97 % (Meyer et al., 2018).

5.3 OBECNÉ PRINCIPY TLUMENÍ NÁKAZY

Při řešení jakékoliv nákazy v chovu skotu by měla být přijata opatření proti zavlečení nákazy do chovu. Dodržování těchto opatření sníží riziko zavlečení infekce do neinfikovanému chovu a zabrání dalšímu zvyšování prevalence infekce v již infikovaných chovech. Náklady spojené s prevencí zavlečení infekce do chovu jsou vždy nižší než případné tlumení infekce.

V infikovaném chovu by mělo být přistoupeno k tlumení nákazy přijetím opatření vycházejícím ze znalostí o šíření infekce mezi zvířaty v chovu. Tato opatření v zásadě redukují počet infikovaných zvířat v chovu jejich přímým vyřazením a nepřímo zabráněním infikovaní vnímavých jedinců. K uskutečnění těchto opatření je nutno detekovat infikovaná zvířata vhodnými dostupnými diagnostickými metodami.

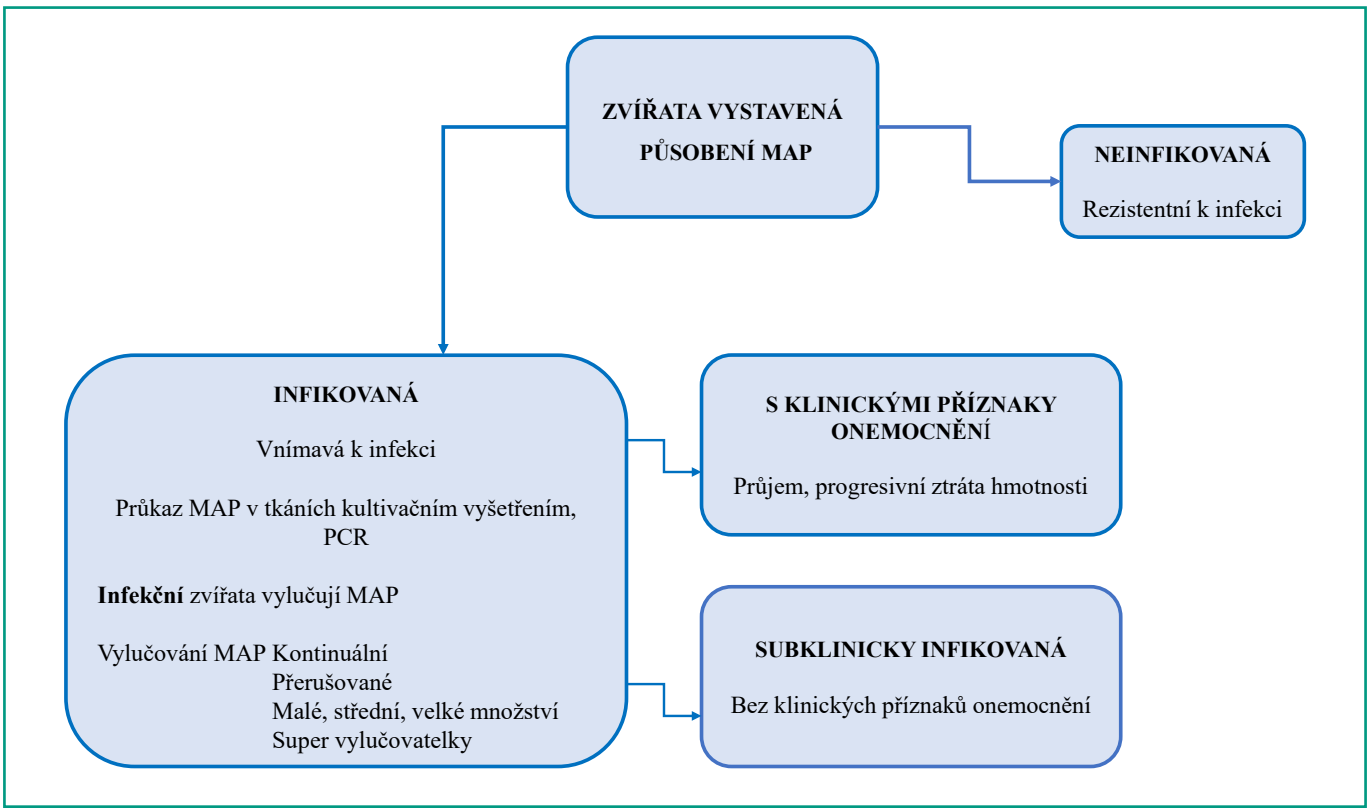
Chovatelé by měli být poučeni o rizikovém chování zvyšujícím pravděpodobnost infikovaní jejich zvířat, měli by znát základní principy šíření infekce v chovu a opatření nutných k tlumení počtu infikovaných zvířat. Dále by měli být schopni dodržovat vysoký hygienický standard a zásady biosecurity. Bez poučeného spolupracujícího chovatele nemůže být tlumení nákazy v chovu úspěšné.

Efektivní tlumení nákazy se opírá o:

1. Ochota chovatele tlumit nákazu
2. Prevence zavlečení infekce do chovu
3. Snížení počtu infikovaných zvířat jejich vyřazením a prevencí infikování vnímavých jedinců

5.3.1 Ochota chovatele tlumit nákazu

Ochota chovatele tlumit paratuberkulózu v chovu vychází jednak z jeho vnitřních postojů, jednak je ovlivňována vnějšími vlivy, kterými jsou především jeho nabyté zkušenosti a znalost nákazy. Změna postoje chovatele může být ovlivněna i společenským vnímáním nákazy jako problému bezpečnosti potravin a zdraví lidí. Chovatelé uvádí jako



Obrázek 8: Kategorizace zvířat vystavených působení MAP

hlavní důvod pro zavedení kontrolních opatření v chovech především zlepšení zdraví a welfare zvířat a vyšší ziskovost chovu. Většina z nich chce také znát nákazovou situaci v chovech, ze kterých pocházejí jimi nakupovaná zvířata. Na druhou stranu za nejčastější příčinu neochoty řešit paratuberkulózu bývá uváděna nízká přesnost a cena diagnostických testů a potenciální nutnost vynaložení určitého úsilí k zvýšení hygienického standardu v chovu.

Na základě přesvědčení o infikování svých chovů, ochoty zavést kontrolní opatření a vnímání paratuberkulózy jako nebezpečné nákazy lze chovatele rozdělit na poučené skeptiky, popírače, a stoupence s nebo bez předchozích zkušeností s tlumením nákazy (Zoche-Golob et al., 2021). Poučený skeptik není primárně přesvědčen o užitečnosti zavádění kontrolních opatření do chovu a nevnímá paratuberkuózu za problém bezpečnosti potravin. Tito chovatelé ale projevují zájem vzdělávat se a lze je považovat za potenciální stoupence kontrolních programů. Popírači nepovažují paratuberkulózu za nebezpečnou nákazu zvířat ani potenciální příčinu zdravotních problémů lidí. Neshledávají žádný důvod k tlumení nákazy i v prokazatelně infikovaných chovech. Stoupenci tlumení nákazy si vážně uvědomují riziko možného nepříznivého vnímaní potravin živočišného původu vzhledem ke spojování MAP s Crohnovou chorobou lidí. Podporují veškerá opatření k omezení prevalence MAP v populaci skotu.

Společenství chovatelů je velmi rozmanité a nelze je striktně rozdělit na zástupce výše jmenovaných skupin. Při přesvědčování chovatelů o prospěšnosti tlumení paratuberkulózy by se mělo přistupovat individuálně s ohledem na postoj chovatele a aktuální situaci v chovu.

5.3.2 Prevence zavlečení nákazy do chovu

Proti zavlečení, popřípadě pro snížení rizika zavlečení nákazy do chovu by měla být dodržována následující opatření:

- Nahrazovat vyřazené dojnice vlastními odchovanými jalovicemi (uzavřený obrat stáda)
- Při nákupu nových zvířat vybírat jedince z prověřených chovů s nízkým rizikem nákazy, nenakupovat zvířata z infikovaných chovů s vysokou prevalencí infekce nebo chovů s neznámou nákazovou situací
- Zabránit nebo minimalizovat kontaktu vlastních zvířat se zvířaty z jiných chovů (výstavy, aukce)
- Nevyužívat zařízení, která by mohla být kontaminována hnojem z jiných (infikovaných) chovů
- Vyžadovat dodržování zásad biosecurity od osob přicházejících do chovu mající možný kontaktem s jinými chovy (veterinární lékaři, inseminační technici, jiné návštěvy v chovech)
- Provádět pravidelná kontrolní vyšetření k potvrzení statusu chovu bez nákazy nebo pro případný včasný zásah pro odhalení infekce v chovu

5.3.3 Tlumení nákazy v infikovaném chovu

Během progrese infekce dochází u infikovaných jedinců ke změnám, které předurčují, jak s nimi bude v rámci tlumení infekce v chovu nakládáno. Jednotlivé kategorie zvířat proto musí být jasně definovány stejně jako základní epizootologické pojmy (Whittington et al., 2017). Klasifikace jednotlivých skupin zvířat je názorně uvedena na Obrázku 8.

Tabulky 4: Interpretace výsledků rutině využívaných diagnostických metod

Detekce MAP ve výkalech	Množství MAP ve výkalech	Detekce Ab	S/P	Interpretace výsledku
NE		NE		Neinfikované zvíře (rezistentní, citlivé k infekci) Pomalá neprogreující perzistentní infekce Latentní fáze Johneho choroby
ANO		NE		Pomalá neprogredující perzistentní ingekce Subklinická fáze Johneho choroby
ANO	<35 CFU >35 CFU	ANO	S/P<1,6 S/P>1,6	Subklinická fáze Johneho choroby Klinická, pokročilá fáze Johneho choroby

Legenda: CFU = jednotka tvořící kolonii (colony forming unit), S/P = poměr absorbance vzorku k pozitivnímu kontrolnímu séru

Zvířata rezistentní k infekci
Zvířata, u kterých po vystavení MAP, nedochází k infekci, nebo je infekce v jejich těle eliminována (nelze prokázat infekční/živé MAP v organismu).

Vnímavá zvířata
Zvířata, která jsou po vystavení působení MAP infikována.

Infikovaná zvířata
Zvířata v jejichž tkáních lze prokázat přítomnost MAP kultivačním vyšetřením nebo pomocí PCR.

Subklinicky infikovaná zvířata
Infikovaná zvířata bez zjevných klinických projevů onemocnění.

Zvířata s klinickými příznaky onemocnění
Infikovaná zvířata s klinickými projevy onemocnění: progresivní hubnutí, průjem (profúzní, kašovitý až vodnatý).

Infekční zvířata
Infikovaná zvířata, která vylučují živé MAP výkaly nebo mlékem. Množství vylučovaných MAP může být kvantifikováno. To slouží ke kategorizaci zvířat na jedince vylučující malé (<35 CFU/g), střední (35–75 CFU/g) a velké (>75 CFU/g) množství MAP. Krávy vylučující velmi velké množství MAP jsou označována jako super vylučovatelky (≥10 0000 CFU/g). Vylučování MAP může být kontinuální nebo přerušované (intermitentní).

Progresivní infekce
Progresivní kontinuální vylučování MAP spojené s progresivním nárůstem množství Ab.

Neprogresivní infekce
Dlouhodobé vylučování malého množství MAP bez detekovatelného množství Ab.

Prevalence infekce
Podíl infikovaných dospělých zvířat detekovaných současnými diagnostickými metodami. Vzhledem k nízké citlivosti diagnostických metod detekovat infikovaná zvířata v časných stádiích infekce (viz kapitola 4.4) takto stanovená výše prevalence neodpovídá skutečnému rozšíření infekce. Skutečnou prevalenci lze vypočítat v závislosti na Se a Sp použitého testu pomocí rovnice (Rogan & Gladen, 1978):

$$Skutečná\ prevalence = \frac{Detekovaná\ prevalence + (Sp\ testu - 1)}{Sp\ testu + (Se\ testu - 1)}$$

V textu termín prevalence, pokud to není výslovně uvedeno jinak, představuje prevalenci stanovenou diagnostickými metodami.

Tlumení infekce v chovech je založeno na: 1. detekci a odstranění infikovaných zvířat a 2. na předcházení infikování vnímavých jedinců (prevence infekce). Jednotlivé strategie se mohou lišit v závislosti na cílech, kterých má být dosaženo (stabilizace situace v chovu, snížení prevalence, eradikace) a to především výběrem diagnostických metod a přísností prováděných opatření.

Strategie tlumení infekce by měla být také přizpůsobena podmínkám v konkrétním chovu, a to jak vzhledem k prevalenci infekce, tak vzhledem k praktikované chovatelské praxi a zoohygienickým podmínkám ovlivňujícím riziko přenosu infekce na vnímavá zvířata. Nedílnou součástí zavadění kontrolních programů do chovu je i přesvědčení chovatele o prospěšnosti prováděných opatření, která jsou ve většině finančně zatěžují, aby byla zaručena jeho ochota spolupracovat.

Prevence přenosu infekce
Nejvnímavější k infekci jsou novorozená telata a mladý skot do jednoho roku stáří. Telata se mohou infikovat orofekální cestou mykobaktériemi z prostředí nebo kolostrem/mlékem. Prostředí poroden/porodních boxů je kontaminováno výkaly infikovaných krav. Snížení rizika přenosu infekce z dospělých infikovaných, infekčních krav na vnímavá telata prostřednictvím kontaminovaného prostředí lze dosáhnut prostorovou separací matek

Obrázek 9: Ilustrační fotografie ustájení nejmladších telat ve venkovních budkách zajišťující separaci vnímavých jedinců od stájového prostředí matek

a telat bezprostředně po porodu. K zamezení napojení telat kontaminovaným kolostrem/mlékem je třeba znát infekční status matky.

K snížení rizika přenosu infekce na novorozená a starší telata by měly být dodržovány následující zásady:

- Oddělené telení krav, které byly identifikovány jako infikované (průkaz Ab, MAP)
- Udržování čistoty v porodních boxech s čistou podestýlkou
- Zajistit čistotu krav v porodních boxech, bez znečistění srsti mrvou
- Odstranění telat z prostředí porodního boxu bezprostředně po porodu a nezbytném ošetření (do dvou hodin od porodu)
- Napájení telat pouze kolostrem matek, které byly vyšetřeny, a nebyla u nich prokázána infekce
- Nezkrmovat kolostrum od krav s neznámým infekčním statusem (nevyšetřené)
- Dodržet hygienický odběr kolostra ze struků neznečištěných mrvou
- Nesměšovat kolostrum, telata napájet kolostrem získaným od jedné krávy
- Udržovat v čistotě vybavení využívané k napájení telat
- Využít komerční náhražku kolostra v chovech, kde nelze zajistit bezpečné kolostrum
- Separátní odchov telat v prostorách bez dospělých jedinců (Obrázek 9)
- Zamezit kontaminaci prostor vyhrazených pro odchovávaný skot mrvou dospělých zvířat
- Odchovávané jalovičky napájet mléčnou náhražkou, nezkrmovat odpadní mléko

Kromě orofekálního přenosu, mohou být telata infikována intrauterinně. K minimalizaci rizika přenosu infekce touto cestou by neměly být infikované krávy zapouštěny. S progresí infekce roste pravděpodobnost přenosu infekce z matky na tele. Jalovice narozené kravám v klinické fázi onemocnění by měly být z chovu vždy vyřazeny.

Detekce a odstranění infikovaných jedinců (strategie otestuj-a-vyřaď)

K detekci infikovaných zvířat v chovu slouží průkaz Ab ELISA testem a MAP pomocí kultivačního nebo PCR vyšetření. Specifita a citlivost těchto metod detekovat krávy v pozdějších fázích infekce vylučujících větší množství MAP (≥50 CFU/g) je srovnatelná (Tabulka 3) (Smith et al., 2015).

Progrese infekce u zvířat, které lze detekovat současnými diagnostickými metodami, postoupila do fáze, kdy buněčná složka imunity není nadále efektivní kontrolovat infekci. Ve stěně střeva jsou naakumulované infikované makrofágy, které tvoří bariéru pro fyziologickou funkci střeva, vstřebávání živin. Zvířata trpí progredující

malabsorpcí, která se může projevit snížením produkčních a reprodukčních ukazatelů a případně vyšší nemocností zvířat. S progresí infekce stoupá počet vylučovaných MAP i množství detekovaných Ab (Tabulka 4). U zvířat vylučujících velké množství MAP, s velkým množstvím Ab lze očekávat progresi onemocnění spojenou se zhoršováním výživového stavu a demonstrací klinických příznaků ukončenou úhynem zvířete. Infikovaná zvířata vylučující MAP jsou zdrojem infekce pro vnímavé jedince.

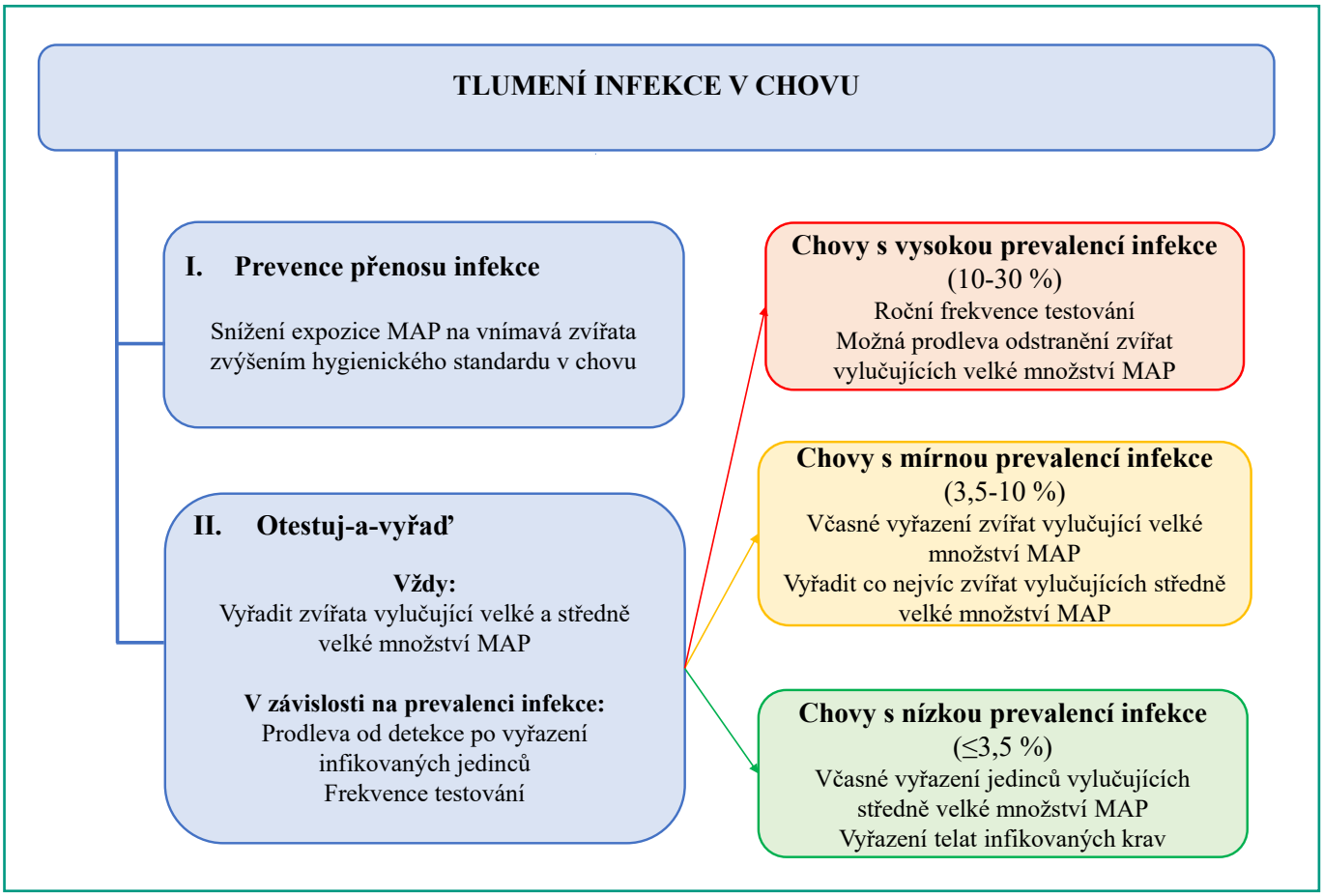
Důvodem pro odstranění infikovaných krav je jejich zhoršující se zdravotní stav spojený s nižší produkcí a vylučování MAP těmito zvířaty. MAP vylučované do prostředí sloužící jako zdroj infekce k infikování vnímavých jedinců čímž zajišťují perzistenci infekce v chovu.

V teoretických studiích využívajících modelů ke studiu vlivu jednotlivých opatření zaváděných do chovu k tlumení infekce bylo prokázáno, že efektivita těchto opatření je ovlivněna možností přenosu a prevalencí infekce v chovu. Podmínky v chovu jako je udržování vysokého hygienického standartu společně se separací mladého a dospělého skotu, ovlivňují míru rizika přenosu infekce na vnímavé jedince. Na tomto základě rozlišujeme chovy s nízkým (dobře řízené, s vysokým hygienickým standardem) a vysokým rizikem (špatně řízené, nízkým hygienickým standardem) přenosu infekce. K efektivní kontrole přenosu infekce v dobře řízených chovech je dostačující odstranit zvířata vylučující velké množství MAP. Naopak v chovech s nízkým hygienickým standardem je kromě okamžitého odstranění zvířat vylučujících velké množství nutno vyřadit i zvířata vylučující malé množství MAP (Lu et al., 2008). V rámci tlumení infekce v chovu je odstranění zvířat vylučujících malé množství MAP velmi efektivní, protože tím je elimininováno potenciální vylučování velkého množství MAP těmito jedinci v rozvinutější formě onemocnění a tím i riziko přenosu infekce na větší počet vnímavých jedinců.

V chovech s nízkou úrovní hygieny je pozitivní efekt vyřazování infikovaných jedinců na snížení prevalence zřetelnější. V těchto chovech spočívá minimalizace rizika přenosu infekce na vnímavé jedince, jinak zajišťovanou vysokou úrovní hygieny, na snížení infekčního tlaku prostředí odstraňováním infekčních zvířat. Naproti tomu v chovech s dobrou úrovní hygieny je efekt vyřazování MAP vylučujících zvířat méně výrazný (Kirkeby et al., 2016).

S různou mírou prevalence infekce v chovu se mění i efektivita prováděných kontrolních opatření zaváděných k tlumení infekce v chovu (Camanes et al., 2018). K těmto opatřením patří především podíl identifikovaných a odstraněných infekčních zvířat z chovu a frekvence testování. V chovech s nízkou prevalencí infekce (0–3,5 %) je efektivita tlumení závislá především na podílu vyřazených krav vylučujících středně velké množství MAP a na vyřazování telat infikovaných matek. Kritickým parametrem tlumení v chovech se střední prevalencí (10,5–30 %) je kromě podílu odstraněných krav vylučujících středně velké množství MAP i včasné vyřazení krav vylučujících velké množství MAP. V chovech s vysokou prevalencí infekce (10,5–30 %) závisí efektivita tlumení především na frekvenci testování zvířat.

Všechna zvířata vylučující středně velké a velké množství MAP by měla být z chovu vždy odstraněna. Pouze v chovech s vysokou prevalencí infekce může být odloženo vyřazení infekčních zvířat vylučujících velké množství MAP. S tím, jak klesá prevalence je nutno pro efektivní tlumení infekce vyřazovat i zvířata vylučující menší množství MAP a minimalizovat dobu, kterou stráví vysoce infekční a později i zvířata vylučující menší množství MAP v chovu. V chovech s nízkou prevalencí by se navíc mělo přistoupit k vyřazování telat infikovaných matek. V chovech s nízkým hygienickým standardem, vyšším rizikem přenosu infekce, by měla být uplatňována přísnější opatření. Závislost efektivních kontrolních opatření na prevalenci infekce v chovu je přehledně znázorněn na Obrázku 10.



Obrázek 10: Tlumení infekce v chovu v závislosti na prevalenci infekce

Včasnost odstranění infekčních zvířat je kromě množství vylučovaného MAP ovlivněna i frekvencí vyšetřování zvířat. Vzhledem k chronické povaze infekce zvířata začínají vylučovat MAP v rozmezí od 2 do 10 let od infekce. Proto musí být v rámci tlumení infekce pravidelně vyšetřována, aby byla zajištěna detekce infekčních jedinců co nejdříve od začátku vylučování MAP.

Zvířata vylučující velké množství MAP by měla být eliminována z chovu bezprostředně po získání výsledku vyšetření. Toto pravidlo lze obejít pouze u chovů s vysokou prevalencí infekce, kde tříměsíční prodleva od identifikace po odstranění vysoce infekčních jedinců výrazně neovlivní efektivitu tlumení (Camanes et al., 2018). Vyřazení zvířat vylučující malé množství MAP může být pozdrženo, pokud jsou zvířata pravidelně vyšetřována v šesti měsíčních intervalech o 6 až 12 měsíců bez výraznějšího ovlivnění efektivity tlumení infekce v chovu. Nižší efektivita (74 %) tlumení infekce je pozorována při ročním intervalu mezi vyšetřeními (Lu et al., 2008). Čím delší dobu stráví infekční zvířata v chovu, tím více MAP vyloučí, čímž zvýší pravděpodobnost infikování vnímavých jedinců. Zvířata jsou schopna během doby, kdy vylučují MAP, v průměru infikovat 3 až 4 vnímavá zvířata.

Čas, který stráví infekční zvíře v chovu, je ovlivněn i výběrem diagnostické metody. Doba od odběru vzorku do odečtu výsledku vyšetření může vyžadovat hodiny/dny (ELISA, PCR) až několik měsíců (kultivace). Čím delší je interval mezi jednotlivými vyšetřeními, tím je důležitější vyšetřovat zvířata metodou umožňující rychlé získání výsledku vyšetření jako je ELISA nebo PCR (Lu et al., 2008). Vzhledem k podobné citlivosti diagnostických testů detekovat infekční zvířata v pozdějších fázích infekce vylučujících MAP (Tabulka 3), je metodou volby vzhledem k nižším nákladům ELISA test.

Efektivitu tlumení infekce v chovu v neposlední řadě ovlivňuje i ochota chovatele dodržovat doporučená opatření. Pokud je z chovu odstraněno 60 % a méně krav, které jsou označeny jako infikované a měly by být odstraněny, nedochází v infikovaných chovech k poklesu prevalence infekce. V chovech s nízkou prevalencí infekce, kde chovatel není přímo konfrontován s klinickými příznaky MAP, bývá ochota vyřazovat označená zvířata nižší, což může vést k dlouhodobé perzistenci infekce v chovu (Kirkeby et al., 2018).

Efektivita kontrolních programů opírajících se o minimalizaci rizika přenosu infekce a strategii testuj-a-vyřaď byla prověřena v praxi. Snížení prevalence infikovaných zvířat společně s redukcí počtu jedinců s klinickými projevy onemocnění bylo pozorováno během desetiletého období tlumení infekce v 8 chovech (Espejo et al., 2012). Mezi kravami narozenými po zavedení kontrolních opatření v infikovaných chovech byl nalezen výrazně nižší počet jedinců vylučujících MAP a pozorován pokles rizika přenosu infekce (Arango-Sabogal et al., 2017). Collins et

al. (2010) publikovali ve své studii redukci počtu infikovaných zvířat v devíti chovech během šestiletého období z celkových 11,6 % na 5,6 %. Pokles prevalence sérologicky pozitivních krav z 26 % na 2,3 % během čtyřletého období uplatňování kontrolních opatření byl ukázán i v další studii (Bates et al., 2019).

- Infikovaná zvířata vylučující MAP musí být z chovu odstraněna
- Výběr prováděných opatření je ovlivněn prevalencí infekce a zoohygienickými podmínkami v chovu
- K detekci infikovaných infekčních jedinců musí být krávy opakovaně vyšetřovány v pravidelných intervalech
- Čím delší interval mezi vyšetřeními tím vhodnější diagnostická metoda umožňující včasné vyhodnocení výsledku (ELISA, PCR)
- Efektivitu tlumení ovlivňuje i ochota chovatele uplatňovat doporučená opatření

6. TLUMENÍ PARATUBERKUÓZY V CHOVECH DOJENÉHO SKOTU V ČR

Základním předpokladem ke kvalifikovanému rozhodnutí tlumení nákazy je znalost jejího rozšíření mezi a uvnitř jednotlivých chovů. Celková aktuální nákazová situace v ČR není známá. Studie z roku 2018 (Kovařčík & Králová, 2018) ale ukázala poměrně vysoký podíl chovů s detekovatelným množstvím Ab v bazénových vzorcích mléka (BVM). Celkem bylo jednorázově vyšetřeno 786 BVM, z nichž v 90 (11,5 %) byla prokázána přítomnost specifických Ab ELISA testem. Vzhledem k citlivosti této metody identifikovat chovy s prevalencí infekce okolo 10 %, lze předpokládat, že v detekovaných chovech je prevalence infekce minimálně 10 % nebo vyšší. Kromě vyšetření BVM byla nákazová situace v chovech zhodnocena i vyšetřením směsných fekálních vzorků prostředí (Kovařčík et al., 2020b). Ze 157 vzorků byla MAP prokázána ve 47 (29,9 %). Výběr chovů v této studii nebyl ale náhodný, byl založen na ochotě chovatele nechat testovat své stádo. Dvacet chovatelů potvrdilo výskyt MAP v chovu v minulosti. Po vyloučení těchto chovů klesla zjištěná prevalence na 20 %. Nedostatkem této studie byl i malý počet vyšetřených vzorků. Z uvedených výsledků obou studií lze tak pouze konstatovat, že stanovená prevalence infekce mezi chovy je vyšší než 10 %. Tato hodnota udává zjištěnou ne skutečnou prevalenci infekce mezi chovy, kterou lze ale vypočítat (viz kapitola 5.3.3). Přesnou hodnotu Se a Sp použitého ELISA testu detekovat infikované chovy vyšetřením BVM neznáme, ale za využití publikovaných průměrných hodnot Se 80 % a Sp 60 % (Pesquira et al., 2017) činí vypočítaná skutečná prevalence 27,5 %. To ukazuje na poměrně vysokou míru prevalence infekce mezi chovy v ČR, která je relevantním důvodem pro tlumení nákazy.

Cílem tlumení infekce v ČR je snížení prevalence infekce v rámci chovu (počet infikovaných zvířat v chovu) a mezi chovy (počet infikovaných chovů). K jeho dosažení byla vypracována certifikovaná metodika: Postup tlumení paratuberkulózy v chovech mléčného skotu (Slaná & Kovařčík, 2014), který vychází ze základních principů tlumení PTB: snížení rizika přenosu infekce na vnímavá zvířata a strategii testuj-a--vyřaď. K zvýšení motivace chovatelů a pro ohodnocení míry rizika infekce v jednotlivých chovech byla následně vypracována certifikovaná metodika: Paratuberkulóza-certifikační program v chovech dojeného skotu (Kovařčík et al., 2020a).

6.1 POSTUP TLUMENÍ NÁKAZY V CHOVECH

Nejdříve je zjištěn nákazový status a jednotlivé chovy jsou rozděleny podle prevalence na chovy s vysokou (>12 %), střední (6-12 %) a nízkou (<6 %) prevalencí. Čtvrtou kategorii tvoří chovy se sporadickým výskytem Ab pozitivních zvířat, nebo chovy dlouhodobě bez sérologicky pozitivních zvířat. K rozdělení chovů do jednotlivých kategorií lze využít plošného testování zvířat nebo je prevalence v chovu odhadnuta z výsledku vyšetření konkrétní diagnostické metody určené k zjištění nákazového statusu stáda (viz kapitola 5.2.2).

K zamezení přenosu infekce na vnímavá zvířata jsou v chovu uplatňována dříve uvedená opatření (viz kapitola 5.3.3). Strategie otestuj-a-vyřaď je založena na detekci infikovaných krav ELISA testem během periody stání na sucho před očekávaným termínem porodu. K dohledání infikovaných zvířat jsou vyšetřovány individuální vzorky krve nebo mléka ELISA testem k detekci Ab. Na základě ELISA vyšetření lze krávy rozdělit na sérologicky pozitivní (přítomnost Ab v séru) a negativní (absence Ab v séru). Podle výše hodnoty S/P poměru jsou pak sérologicky pozitivní jedinci ohodnoceny systémem křížků. Čím více křížků, tím vyšší poměr S/P, tím větší množství Ab v séru. Dosažený počet křížků ovlivňuje opatření, kterému jsou kráva a její potomek v rámci tlumení podrobeni.

+++ Krávu vyřadit v co nejkratším termínu z chovu, tele jalovičku nevyužít k obnově stáda, může být společně s teletem býčkem vykrmena v prostorově oddělené výkrmně

++ Krávu označit a evidovat jako infikovanou, nezapouštět, při poklesu dojivosti nebo objevení přidružených zdravotních problémů nebo klinických příznaků spojených s PTB vyřadit z chovu, tele jalovičku napojit bezpečným kolostrem, možno odchovat a zařadit do chovu

+ Kráva se inseminuje, tele jalovička odchová, při objevení klinických příznaků PTB krávu vyšetřit a pokud je prokázáno zvýšení množství Ab, vyřadit z chovu, další opatření dle výsledku ELISA vyšetření před následným porodem

Tato doporučení platí zejména pro chovy se středním podílem sérologicky pozitivních zvířat. Opatření by měla být prováděna s ohledem na prevalenci infekce a měla by být přizpůsobena konkrétní situaci (jiná onemocnění, zdravotní problémy…) v chovu. V chovech s vysokým podílem Ab pozitivních zvířat by neměla prováděná opatření omezit obnovu stáda odchovem vlastních jalovic. S klesající prevalencí infekce může být přistoupeno k přísnějšímu uplatňování opatření. V chovech s nízkou prevalencí infikovaných jedinců (≤2%) by měly být vyřazeny krávy bez ohledu na systém křížků (množství Ab), nebo by měly být vyřazeny na základě detekce MAP ve výkalech.

Efektivita strategie tlumení PTB popsané v metodice: Postup při tlumení paratuberkulózy v chovech mléčného skotu byla prokázána snížením počtu sérologicky pozitivní zvířat v chovech dlouhodobě uplatňujících opatření v ní obsažené (Fichtelová et al. 2021a).

6.2 CERTIFIKAČNÍ PROGRAM

Certifikační program je vhodným nástrojem k ohodnocení nákazové situace v ČR a ke sledování změn v prevalenci infekce v rámci jednoho chovu a mezi chovy. Přínosem zapojení chovatelů do programu je bezesporu posílení motivace ke snižování prevalence infekce v chovech, které je nutné při přechodu chovu z horšího k lepšímu nákazovému statusu. Ohodnocení chovů vzhledem k riziku infekce zvířat v nich ustájených bude také využito zvláště při nákupu zvířat, kdy by se chovatelé měly vyvarovat nákupu zvířat z chovů s nepříznivým nákazovým statusem.

V rámci certifikačního programu je ohodnocena míra rizika infekce v jednotlivých chovech pomocí čtyř vymezených nákazových statusů A, B, C a D. Jednotlivé statusy jsou chovům přiděleny na základě výsledku vyšetření diagnostickými metodami, jejichž citlivost detekovat infikované chovy závisí na prevalenci infekce v nich (Obrázek 11). Chovy budou certifikovány na základě výsledků vyšetření bazénového vzorku mléka (BVM) ELISA testem, vyšetření směsného vzorku prostředí (SVP) metodou PCR a vyšetření individuálních vzorků krve nebo mléka ELISA testem. Ke konfirmaci infekce u sérologicky pozitivních zvířat z chovů s nákazovým statusem A budou navíc vyšetřovány vzorky výkalů pro průkaz MAP kultivačním vyšetřením a PCR.

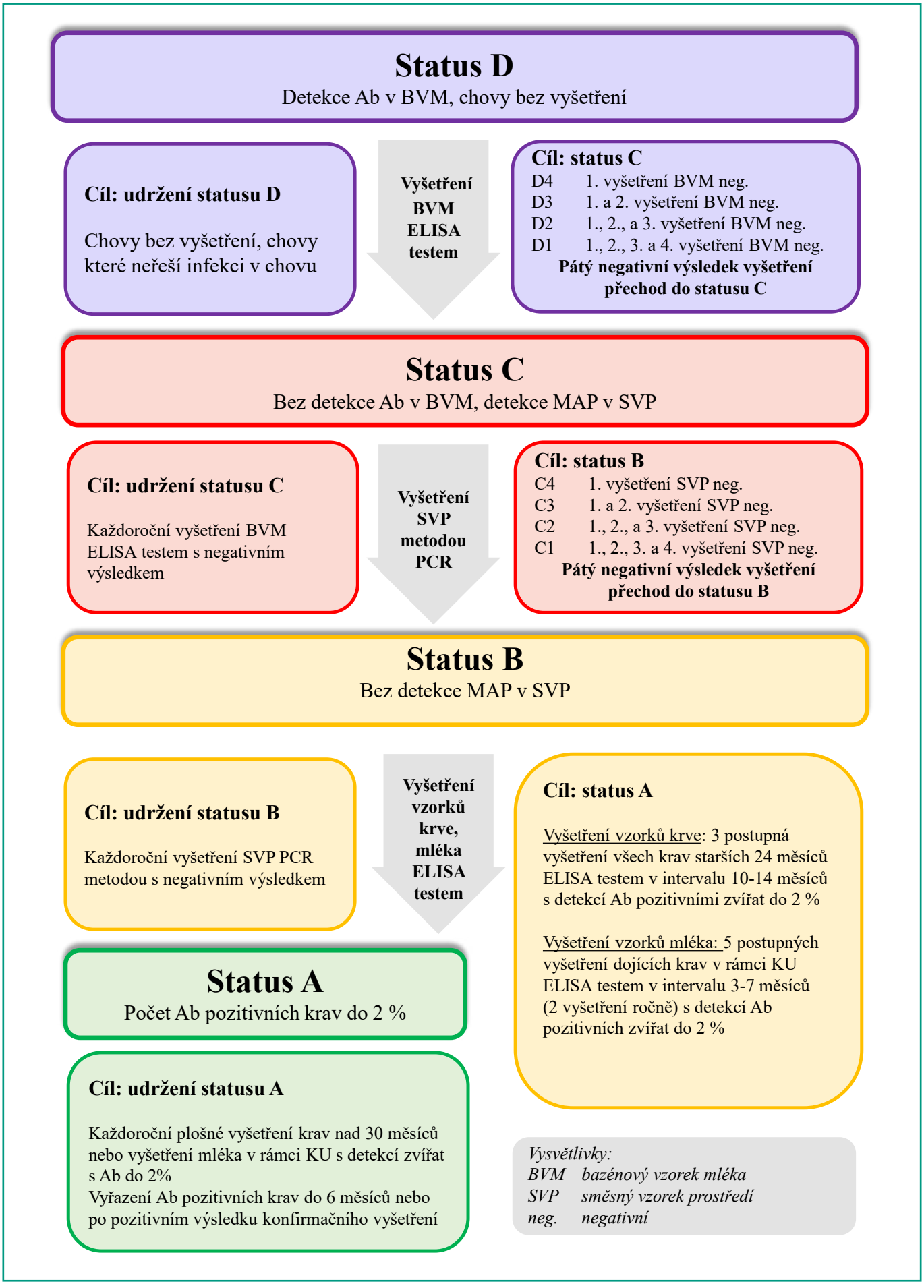
Chovatel si stanoví konečný status, kterého chce dosáhnout, sám. Chovatelům budou výsledky certifikace zpřístupněny v rámci webové aplikace: Přístup k datům z kontroly užitkovosti Českomoravské společnosti chovatelů a.s. (ČMSCH a. s).

Nákazový status D – vysoce rizikové hospodářství

Hodnotící vyšetření:

- vyšetření bazénového vzorku mléka (BVM) ELISA testem
- žádné cílené vyšetření k detekci PTB v chovu

Nákazový status D je přiřazen chovům s detekcí Ab v BVM, u nichž lze předpokládat vysokou prevalenci sérologicky



Obrázek 11: Statusy certifikačního programu

pozitivních zvířat ⩾10–12 % nebo chovům, u kterých nebylo provedeno žádné vyšetření k odhalení PTB, tedy chovům s neznámou nákazovou situací.

Pro získání statusu C je nutno 5 postupných negativních vyšetření BVM v rozmezí 3–7 měsíců od předchozího vyšetření. S každým negativním výsledkem vyšetření v řadě stoupá klasifikace chovu v rámci dílčích statusů od D4 po D1. Pro přehlednost číslo dílčího statusu souhlasí s počtem vyšetření nutných pro zařazení do hierarchicky vyššího statusu.

Dílčí statusy:
- D4 první postupné vyšetření BVM negativní
- D3 první a druhé postupné vyšetření negativní
- D2 první, druhé a třetí postupné vyšetření negativní
- D1 první, druhé, třetí a čtvrté postupné vyšetření negativní

Následné negativní vyšetření BVM přiřadí chov k nákazovému statusu C.

Nákazový status C – středně rizikové hospodářství

Hodnotící vyšetření:
- vyšetření BVM ELISA testem
- vyšetření směsného vzorku prostředí (SVP) metodou PCR

Nákazový status C je definován absencí Ab v BVM společně s přítomností MAP ve SVP. Do této kategorie spadají chovy s předpokládanou prevalencí sérologicky pozitivních zvířat ⩽10–12 %

Na základě aktuálních podmínek v chovu se může chovatel rozhodnou setrvat v dosaženém statusu C nebo usilovat o status B. Pro setrvání chovu v statusu C je požadován negativní výsledek vyšetření BVM ELISA testem prováděným kontinuálně v rozmezí 10–14 měsíců. Získání statusu B je podmíněno absencí MAP v pěti po sobě následujících SVP odebraných v rozmezí 3–7 měsíců od předchozího vyšetření. Chovy jsou opět klasifikovány vzhledem k počtu negativních vyšetření ve škále C4 až C1.

Dílčí statusy:
- C4 první postupné vyšetření SVP negativní
- C3 první a druhé postupné vyšetření SVP negativní
- C2 první, druhé a třetí postupné vyšetření SVP negativní
- C1 první, druhé, třetí a čtvrté postupné vyšetření SVP negativní

Následné negativní vyšetření SVP přiřadí chov k nákazovému statusu B.

Cílový status C lze získat výše zmíněným postupem opakovaným testováním stáda v pravidelných intervalech s postupným přiřazováním chovu k dílčím postupným statusům D4 až D1, nebo může chovatel využit testování chovu rovnou vyšetřením SVP, kdy první negativní výsledek přiřadí chov ke statusu C4.

Nákazový status B – hospodářství s kontrolovaným rizikem

Hodnotící vyšetření:
- vyšetření SVP metodou PCR

V chovech přiřazených ke statusu B nebyla prokázána přítomnost MAP ve SVP vyšetřených pomocí PCR. V těchto chovech se předpokládá přítomnost MAP vylučujících zvířat ⩽3–4 %.

Chovatel, který chce deklarovat status B, musí kontinuálně vyšetřovat SVP v 10 až 14 měsíčních intervalech. Výsledky vyšetření musí být negativní. Pokud chce chovatel postoupit do nejlepšího nákazového statusu A musí provést individuální vyšetření vzorků krve nebo mléka. Při vyšetřování vzorků krve jsou provedena tři následná vyšetření krav starších 24 měsíců v intervalu 10–14 měsíců. Při využití vzorků mléka se provádí pět následných vyšetření krav v intervalu 3–7 měsíců, a to tak aby za rok byla provedena dvě vyšetření. Pro deklarování statusu A nesmí podíl Ab pozitivních zvířat přesáhnout hranici 2 %.

Nákazový status A – hospodářství s malým rizikem

Hodnotící vyšetření:
- individuální vyšetření vzorků krve, mléka

V chovech s deklarovaným statusem A lze očekávat ojedinělý výskyt sérologicky pozitivních krav vylučujících MAP.

Pro setrvání ve statusu A jsou odebírány buď vzorky mléka v rámci kontroly užitkovosti, nebo vzorky krví krav starších 30 měsíců. Podíl sérologicky pozitivních zvířat vyšetřovaných v 10–14 měsíčním intervalu nesmí přesáhnout 2 %. Sérologicky pozitivní krávy musí být z chovu vyřazeny nejpozději šest měsíců od pozitivního výsledku vyšetření, nebo u nich musí být nejpozději do 31 dní od pozitivního výsledku vyšetření provedeno konfirmační vyšetření. K potvrzení infekce u Ab pozitivních krav je odebrán vzorek trusu k průkazu MAP kultivačním vyšetřením nebo pomocí PCR, nebo je odebrán nový vzorek krve a vyšetřen konfirmačním ELISA testem. Negativní výsledek konfirmačního testu neguje výsledek předchozího vyšetření.

7. ZÁVĚR

Paratuberkulóza je chronické střevní onemocnění skotu, které vždy končí úhynem klinicky postižených zvířat. K minimalizaci ekonomických ztrát je v postižených chovech přistupováno k tlumení nákazy snížením rizika infikování vnímavých zvířat společně s eliminací infikovaných jedinců vylučujících MAP. Zaváděná kontrolní opatření vycházejí z teoretických poznatků především o patogenezi a přenosu infekce mezi zvířaty. Tlumení infekce v chovu vyžaduje dlouhodobé pravidelné testování a vyřazování zvířat. Paradoxně se zlepšující se nákazovou situací musí být v chovech dodržována přísnější opatření. Metodika tlumení nákazy a certifikační program poskytují chovatelům rámec k tlumení nákazy v chovech.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Al-Mamun M., Smith R.L., Schukken Y.H., & Gröhn Y.T. (2016). Modeling of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis dynamics in a dairy herd: An individual based approach. Journal of Theoretical Biology, 408, 105–117. https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2016.08.014

Aly S.S., Anderson R.J., Adaska J.M., Jiang J., & Gardner I.A. (2009). Association between Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infection and milk production in two California dairies. Journal of Dairy Science, 93(3), 1030–1040. https://doi.org/10.3168/jds.2009-2611

Aly S.S., Mangold B.L., Whitlock R.H., Sweeney R., Anderson R.J., Jiang J., Schukken Y.H., Hoving E., Wolfgang D., Van Kessel J.A.S., Karns J.A.S., Lombard J.E., Smith J.M., & Gardner I.A. (2010). Correlation between Herrold's eggs yolk medium culture and real-time polymerase chain reaction results for Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in pooled fecal and environmental samples. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 22(5), 677–683. https://doi.org/10.1177/104063871002200501

Aly S.S., Anderson R.J., Whitlock R.H., Fyock T.L., McAdams S.C., Byrem T.M., Jiang J., Adaska J.M., & Gardner I.A. (2012). Cost-effectiveness of diagnostic strategies to identify Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis super-shedders cows in a large dairy herd using antibody enzyme-linked immunosorbent assays, quantitative real-time polymerase chain reaction, and bacterial culture. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 24(5), 821–832. https://doi.org/10.1177/1040638712452107

Arango-Sabogal J.C., Paré J., Labrecque O., Côte G., Roy J.P., Buczinski S., Wellemans V., & Fecteau G. (2017). Incidence of fecal excretion of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in dairy cows before and after the enrolment in the Québec voluntary program. Preventive Veterinary Medicine, 148, 94–105. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.10.006

Arsenault R.J., Maattanen P., Daigle J., Potter A., Griebel P., & Napper S. (2014). From mouth to macrophage: mechanism of innate immune subversion by Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. Veterinary Research, 45(1), 54. https://doi.org/10.1186/1297-9716-45-54

Bannantine J.P., Conde C., Bayles D.O., Branger M., & Biet F. (2020). Genetic diversity among Mycobacterium avium subspecies revealed by analysis of complete genome sequences. Frontier in Microbiology, 11, 1701. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01701

Barkema H.W., Orsel K., Nielsen S.S., Koets A.P., Rutten V.P.M.G., Bannantine J.P., Keefe G.P., Kelton D.F, Wells S.J., Whittington R.J., Mackintosh C.G., Manning E.J., Weber M.F., Heuer C., Forde T.L., Ritter C., Roche S., Corbett C.S., Wolf R., Griebel P.J., Kastelic J.P., De Buck J. et al. (2018). Knowledge gaps that hamper prevention and control of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infection. Transboundary and Emerging Diseases, 65(Suppl 1), 125–148. https://doi.org/10.1111/tbed.12723

Bates A., O'Brien R., Liggett S., & Griffin F. (2019). Control of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection on New Zealand pastoral dairy farm. BMC Veterinary Research, 15(1), 266. https://doi.org/10.1186/s12917-019-2014-6

Beaver A., Cazer L.C., Ruegg P.L., Gröhm Y.T., & Schukken Y.H. (2016). Implications of PCR and ELISA results on the route of bulk-tank contamination with Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis. Journal of Dairy Science, 99(2), 1391–1405. https://doi.org/10.3168/jds.2015-9855

Beaver A., Sweeney R.W., Hoving E., Wolfgang D.R., Gröhn Y.T., & Schukken Y.H. (2017). Longitudinal relationship between fecal culture, fecal quantitative PCR and milk ELISA in Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis-infected cows from low-prevalence dairy herds. Journal of Dairy Science, 100(9), 7507–7521. https://doi.org/10.3168/jds.2017-12928

Berghaus R.D., Farver T.B., Anderson R.J., Jaravata C.C., & Gardner I.A. (2006). Environmental sampling for detection of Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis on large California dairies. Journal of Dairy Science 89(3), 963–970. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72161-0

Camanes G., Joly A., Fourichon C., Romdhane R.B., & Ezanno P. (2018). Control measures to prevent increase of paratuberculosis prevalence in dairy cattle herds: an individual-based modelling approach. Veterinary Research 49(1), 60. https://doi.org/10.1186/s13567-018-0557-3

Canive M., Casais R., Jimenez J.A., Blanco-Vazquez C., Amado J., & Garrido J.M. (2020). Correlation between single nucleotide polymorphism in bovine CD209, SLC11A1, SP110 and TLR2 genes and estimated breeding value for several traits in Spanish Holstein cattle. Heliyon, 6(6), e04254). https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04254

Carta T., Alvarez J., Perez de la Lastra J.M., & Cortazar C. (2013). Wildlife and paratuberculosis: A review. Research in Veterinary Science, 94(2), 191–197. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.11.002

Ceres K.M., Schukken Y.H., & Gröhn Y.T. (2020). Characterizing infectious disease progression through discrete states using Markov models. Plos One. 15(11), e0242683. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242683

Collins M.T., Gardner I.A., Garry F.B., Roussel A.J., & Wells S. (2006). Consensus recommendations on diagnostic testing for the detection of paratuberculosis in cattle in United States. Journal of the American Veterinary Medical Association, 229(12), 1912–1919. https://doi.org/10.2460/javma.229.12.1912

Collins M.T., Eggleton V., & Manning E.J.B. (2010) Successful control of Johne's disease in nine dairy herds: Results of six-year field trial. Journal of Dairy Science, 93(4), 1638–1643. https://doi.org/10.3168/jds.2009-2664

Corbett C.S., Naqvi S.A., De Buck J., Kanevets U., Kastelic J.P., & Barkema H.W. (2018). Environmental sample characteristics and herd size associated with decreased herd-level prevalence of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis. Journal of Dairy Science 101(9), 1–8. https://doi.org/10.3168/jds.2018-14661

Delafosse A., Meens E., Rambaud T., Hanoy F., & Achour H. (2019). Sensitivities of bulk-tank milk ELISA and composite fecal qPCR to detect various seroprevalence levels of paratuberculosis in cattle herds in Normandy, France. The Canadian Veterinary Journal, 60(3), 275–281.

Donat K., Kube J., Dressel J., Einax E., Pffefer M., & Failing K. (2015). Detection of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in environmental samples by faecal culture and real-time PCR in relation to apparent within-herd prevalence as determined by individual faecal culture. Epidemiology and Infection, 143(5), 975–985. https://doi.org/10.1017/S0950268814002465

Espejo L.A., Godden S., Hartmann W.L., & Wells J. (2012). Reduction in incidence of Johne's disease associated with implementation of disease control program in Minesota demonstration herds. Journal of Dairy Science, 95(7), 4141–4152. https://doi.org/10.3168/jds.2011-4550

Espejo L.A., Kubat N., Godden S.M., & Wells S.J. (2013). Effect of delayed exposure to Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis on the development of subclinical and clinical Johne's disease. America Journal of Veterinary Research, 74(10), 1304–1310. https://doi.org/10.2460/ajvr.74.10.1304

Espejo L.A., Zagmutt F.J., Groendaal H., Muñoz-Zanzi C., & Wells S.J. (2015). Evaluation of performance of bacterial culture of feces and serum ELISA across stages of Johne's disease in cattle using Bayesian latent class model. Journal of Dairy Science, 98(11), 8227–8239. https://doi.org/10.3168/jds.2014-8440

Fanelli A., Buonavoglia D., Pleite C.M.C., & Tizzani P. (2020). Paratuberculosis at European scale: an overview from 2010 to 2017. Veterinaria Italiana, 56(1), 13–21. https://doi.org/10.12834/VetIt.1829.9692.3

Fechner K., Schäfer J., Wiegel C., Ludwig J., Münster P., Scharifi A.R., Wemheuer, Czerny C.-P. (2017). Distribution of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in subclinical naturally infected German Fleckvieh bull. Transboundary and Emerging Diseases, 64(3), 916–928. https://doi.org/10.1111/tbed.12459

Fichtelová V., Králová A., Babák V., & Kovařčík K. (2021a). Využití sérologického vyšetření dojnic při tlumení Johneho choroby. Veterinářství, 71(9), 530–534.
Fichtelova V., Kralova A., Fleischer P., Babak V., & Kovarcik K. (2021b). Detection of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in environmental samples from infected Czech dairy herds. Veterinarni Medicina, 66(1), 1–7. https://doi.org/10.17221/168/2020-VETMED
Fichtelová V., Králová A., & Kovařčík K. (2021c). Detekce původce partuberkulózy ve dvou chovech s neznámou nákazovou situací. Veterinářství, 71(5), 288–293.
Garcia A.B., & Shaloo L. (2015). Invited review: The economic impact and control of paratuberculosis in cattle herds. Journal of Dairy Science, 98(8), 5019–5039. https://doi.org/10.3168/jds.2014-9241
Garvey M. (2018). Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis: A possible causative agent in human and risk to public health safety. Open Veterinary Journal, 8(2), 172–181. https://doi.org/10.4314/ovj.v8i2.10
Geraghty T., Graham D.A., Mullowney P., & More S.J. (2014). A review of bovine Johne's disease control activities in 6 endemically infected countries. Preventive Veterinary Medicine, 116(1-2), 1–11. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.06.003
Gupta S., Singh S.V., Singh M., Chaubey K.K., Karthik K., Bhatia A.K., Kumar N., & Dhama K. (2019). Vaccine approaches for the "therapeutic management" of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infection in domestic cattle. Veterinary Quarterly, 39(1), 143–152. https://doi.org/10.1080/01652176.2019.1667042
Hulzen van K.J.E., Koets A.P., Nielen M., Heueven H.C.M., & Arendok J.A.M. (2014). The effect of genetic selection for Johne's disease resistance in dairy cattle: results of a genetic-epidemiological model. Journal of Dairy Science, 97(3), 1762–1773. https://doi.org/10.3168/jds.2013-7032
Jenvey C.J., Hostetter J.M., Schircliff A.L., & Stabel J.R. (2018). Relationship between pathology of bovine intestinal tissue and current diagnostic tests for Johne's disease. Veterinary Immunology and Immunopathology, 202, 93–101. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2018.06.012
Jenvey C.J., Hostetter J.M., Schircliff A.L., Bannantine J.P., & Stabel J.R. (2019). Quantification of macrophages and Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in bovine intestinal tissue during different stages of Johne's disease. Veterinary Pathology, 56(5). 671–680. https://doi.org/10.1177/0300985819844823
Juste R.A., Alonzo-Hearn M., Molina E., Geijo M., Vazquez P., Sevilla I.A., & Garrido M. (2009). Significant reduction in bacterial shedding and improvement in milk production in dairy farms after use of new inactivated paratuberculosis vaccine in field trial. BMC Research Notes 2, 233. https://doi.org 10.1186/1756-0500-2-233
Juste R.A., Vazquez P., Ruiz-Larranaga O., Iriondo M., Manzzano C., Agirre M., Estonba A., Geijo M.V., Molina E., Sevilla I.A., Alonzo-Hearn M., Gomez N., Peret V., Cortes A., Garrido J.M. (2018). Association between combination of genetic polymorphisms and epidemiopathogenic forms of bovine paratuberculosis. Helyion 4(2), e00535. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00535
Kirkeby C., Gæsbøll K., Halasa T., Toft N., & Nielsen S.S. (2015). Mean effective sensitivity for Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection in cattle herds. BMC Veterinary Research, 11, 190. https://doi.org/10.1186/s12917-015-0512-8
Kirkeby C., Gæsbøll K., Nielsen S.S., Christiansen L.E., Toft N., Rattenborg E., & Halasa T. (2016). Simulating the epidemiological and economic impact of paratuberculosis control impact actions in dairy cattle. Frontier in Veterinary Science, 3, 90. http//doi.org/10.3389/fvets.2016.00090
Kirkeby C., Gæsbøll K., Nielsen S.S., Toft N., & Halasa T. (2017). Epidemiological and economic consequence of purchasing livestock infected with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. BMC Veterinary Research, 13(1), 202. https://doi.org/10.1186/s12917-017-1119-z
Kirkeby C., Gæsbøll K., & Halasa T. (2018). Evaluating the impact of transmission mode, calibration level and farmer compliance in simulation models of paratuberculosis in dairy herds. Scientific Reports, 8(1), 9100. http//doi.org/10.1038/s41598-018-27518-7
Koets A.P., Eda S., & Sreevatsan S. (2015). The within host dynamic of Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis infection in cattle: where time and place matter. Veterinary Research 46(1), 61. https://doi.org/10.1186/s13567-015-0185-0
Kovařčík K., & Králová A. (2018). Paratuberkulóza – aktuální nákazová situace v ČR podle vyšetření bazénových vzorků mléka. Náš Chov, 78(11), 33–35.
Kovařčík K., Fleischer P., Fichtelová V., Šlosárková S., & Králová A. (2020a) Paratuberkulóza – certifikační program v chovech dojeného skotu. Certifikovaná metodika 131/2020, VÚVeL. https://www.vri.cz/wp-content/uploads/2021/02/131_Final_KovarcikSosvedcenim.pdf
Kovařčík K., Králová A., Fichtelová V., Fleischer P., Šlosárková S. (2020b). Paratuberkulóza – nákazová situace u dojnic v ČR podle prostředí. Náš Chov, 81(11), 22–24.
Lavers C.J., McKena S.L.B., Dohoo I.R., Barkema H.W., & Keefe G.P. (2013). Evaluation of environmental fecal culture for Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis detection in dairy herds and association within apparent within-herd prevalence. The Canadian Veterinary Journal, 54(11), 1053–1060.
Lavers C.J., Barkema H.W., Dohoo I.R., McKenna S.L.B., & Keefe G.P. (2014). Evaluation of milk ELISA for detection of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in dairy herds and association with within-herd prevalence. Journal of Dairy Science, 97(1), 299–309. https://doi.org/10.3168/jds.2013-7101
Lombard J.E., Wagner B.A., Smith R.L., McCluskey B.J., Harris B.N., Payeur J.B., Garry F.B., & Salman M.D. (2006). Evaluation of environmental sampling and culture to determine Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis distribution and herd infection status on US dairy operations. Journal of Dairy Science, 89(11), 4163–4171. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72461-4
Lu Z., Mitchell R.M., Smith R.L., Van Kessel J.S., Chapagain P.P., Schukken Y.H., & Gröhn Y.T. (2008). The importance of culling in Johne's disease control. Journal of Theoretical Biology, 254 (1), 135–146. https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2008.05.008
Lu Z., Schukken Y.H., Smith R., & Gröhn Y.T. (2013). Using vaccination to prevent the invasion of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in dairy herds: A stochastic simulation study. Preventive Veterinary Medicine, 110(3-4), 335–345. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.01.006
Magombedze G., Ngoghala C.N., & Lanzas C. (2013). Evaluation of "Iceberg phenomenon" in Johne's disease through mathematical modelling. Plos One, 8(10), e76636, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076636
Magombedze G., Eda S., & Koets A. (2016). Can immune response mechanisms explain the fecal shedding pattern of cattle infected with Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis? Plos One, 11(1), e0146844. https://doi.org/10.1371/journal.pone.014684
Magombedze G., Shiri T., Eda S., & Stabel J.R. (2017). Inferring biomarkers for Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection and disease progression in cattle using experimental data. Scientific Reports, 7:44765. http://doi.org/doi:10.1038/srep44765
Manning E.J.B., & Collins M.T. (2001). Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: pathogen, pathogenesis and diagnosis. Revue Scientifique and Technique, 20(1), 133–150. http://dx.doi.org/10.20506/rst.20.1.1275
Marce C., Ezanno P., Seegers H., Pfeiffer D.U., & Fourichon C. (2011). Predicting fadeout versus persistence of paratuberculosis in dairy cattle herd for management and control purposes: a modelling study. Veterinary Research, 42, (1), 36. https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-36
Matthews C., Cotter P., & O'Mahony J. (2021). MAP, Johne's disease and the microbiome; current knowledge and future consideration. Animal Microbiome, 3(1), 34. https://doi.org/10.1186/s42523-021-00089-1
McAloon C.G., Whyte P., More S.J., Green M.J., O'Grady L., Garcia A.B., & Doherty M.L. (2016). The effect of paratuberculosis on milk yield–A systematic review and meta-analysis. Journal of Dairy Science, 99(2), 1449–1460. https://doi.org/10.3168/jds.2015-10156
McAloon C.G., Roche S., Ritter C., Barkema H.W., Whyte P., More S.J., O'Grady L., Green M.J., & Doherty M.L. (2019). A review of paratuberculosis in dairy herds – Part 1: Epidemiology. The Veterinary Journal, 246, 59–65. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.01.010
Meyer A., McAloon C.G., Tratalos J.A., More S.J., Citer L.R., Graham D.A., & Sergeant E.S.G. (2018). Modeling of alternative testing strategies to demonstrate freedom from Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis infection in test-negative dairy herds in the Republick of Ireland. Journal of Dairy Science, 102 (3), 2427–2442. https://doi.org/10.3168/jds.2018-14883
Mitchell R.M., Medley G.F., Collins M.T., & Schukken Y.H. (2012). A meta-analysis of the effect of dose and age at exposure on shedding of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis (MAP) in experimentally infected calves and cows. Epidemiology and Infection, 140(2), 231–246. https://doi.org/10.1017/S0950268811000689
Mortier R.A.R., Barkema H.W., & De Buck J. (2015). Susceptibility to and diagnosis of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infection in dairy calves: A review. Preventive Veterinary Medicine, 121(3-4), 189–198. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.08.011
More S.J., Cameron A.R., Strain S., Cashman W., Ezanno P., Kenny K., Fourichon C., & Graham D. (2015). Evaluation of testing strategies to identify infected animals at a single round of testing within dairy herds known to be infected with Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis. Journal of Dairy Science, 98(8), 5194–5210. https://doi.org/10.3168/jds.2014-8211
Müster P., Völkel I., Wemheuer W., Schwarz D., Döring S., & Czerny C.-P. (2013). A longitudinal study to characterize the distribution patterns of Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis in semen, blood and faeces of naturally infected bull by IS900 semi-nested and quantitative real-time PCR. Transboundary and Emerging Diseases, 60(2), 175–187. https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2012.01336.x
Nielsen S.S, & Toft N. (2008). Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon-γ assay and faecal culture techniques. Veterinary Microbiology 129(3-4), 217–235. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.12.011
Nielsen S.S, & Toft N. (2014). Bulk tank milk ELISA for detection of antibodies to Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: correlation between repeated tests and within-herd antibody-prevalence. Preventive Veterinary Medicine, 113(1), 96–102. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.10.013
OIE Terrestrial Manual OnLine Access. (2021, June). Paratuberculosis (Johne's disease). https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.15_PARATB.pdf
Ozsvari L., Harnos A., Lang Z., Monostori A., Strain S., & Fodor I. (2020). The impact of paratuberculosis on milk production, fertility, and culling in large commercial Hungarian dairy herds. Frontiers in Veterinary Science, 7, 565324. https://doi.org/10.3389/fvets.2020.565324

Pesqueira M.N., Yus E., Factor C., Mato I., Sanjuán M.L., Eiras C., Arnaiz I., & Diéguez F.J. (2017). Short communication: Correlation between within-herd antibody-prevalence and bulk tank milk antibody levels of Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis using 2 commercial immunoassays. Journal of Dairy Science, 100(9), 7544–7548. https://doi.org/10.3168/jds.2017-12706
Pillars R.B., Grooms D.L., Woltanski J.A., & Blair E. (2009). Prevalence of Michigan dairy herds infected with Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis as determined by environmental sampling. Preventive Veterinary Medicine, 89(3-4), 191–196. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2009.02.022
Pithua P., Wells S.J., & Godden S.M. (2011). Evaluation of the association between fecal excretion of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis and detection in colostrum and teat skin surfaces of dairy cows. Journal of the American Veterinary Medical Association, 238(1), 94–101. https://doi.org/10.2460/javma.238.1.94
Raizman E.A., Wells S.J., Godden S.M., Bey R.F., Oakes M.J., Bentley D.C., & Olsen K.E. (2004). The distribution of Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis in the environment surrounding Minnesota dairy farms. Journal of Dairy Science, 87(9), 2959–2966. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73427-X
Ramovic E., Madigan G., McDonell S., Griffin D., Bracken E., NiGhallchoir E., Quinless E., Galligan A., Egan J., & Prendergast D.M. (2020). A pilot study using environmental screening to determine the prevalence of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis (MAP) and antimicrobial resistance (AMR) in Irish cattle herds. Irish Veterinary Journal, 73, 3. https://doi: 10.1186/s13620-020-0156-2
Rangel S.J., Paré J., Doré E., Arango J.C., Côte G., Buczinski S., Labrecque O., Fairbrother J.H., Roy J.P., Wellemans V., & Fectau G. (2015). A systematic review of risk factors associated with introduction of Mycobacterium avium supp. paratuberculosis (MAP) into dairy herds. The Canadian Veterinary Journal, 56(2), 469–177.
Rogan W.J., & Gladen B. (1978). Estimating prevalence from results of a screening test. American Journal of Epidemiology 107(1), 71–76. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a112510
Ruzante J.M., Gardner I.A., Cullor J.S., Smith W.L., Kirk J.H., & Adaska J.M. (2008). Isolation of Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis from waste milk delivered to California calf ranches. Foodborne Pathogens and Disease, 5(5), 681–686. https://doi.org/10.1089/fpd.2008.0082
Schönenbrucher H., Abdulmawjood A., Failing K., & Bűlte M. (2008). New triplex real-time PCR assay for detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in bovine feces. Applied and Environmental Microbiology, 74(9), 2751–2758. https://doi.org/10.1128/AEM.02534-07
Schukken Y.H., Whitlock R.H., Wolfgang D., Gröhn Y.T., Beaver A., Van Kessel J.A., Zurakowski M., & Mitchell R. (2015). Longitudinal data collection of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infections in dairy herds: the value of precise field data. Veterinary Research, 46(1), 65. https://doi.org/10.1186/s13567-015-0187-y
Serraino A., Arrigoni N., Ostanello F., Ricchi M., Marchetti G., Bonilauri P., & Bonfante E. (2014). A screening sampling plan to detect Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis-positive dairy herds. Journal of Dairy Science, 97(6), 3344–3351. https://doi.org/10.3168/jds.2013-7803
Sevilla I.A., Garrido J.M., Molina E., Geijo M.V., Elguzabal N., Vazquez P., & Juste R.A. (2014). Development and evaluation of a novel multicopy-element-targeting triplex PCR for detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in feces. Applied and Environmental Microbiology, 80(12), 3757–3768. https://doi.org/10.1128/AEM.01026-14
Slaná I., & Kovarčík K. (2014) Postup při tlumení paratuberkulózy v chovech mléčného skotu. Certifikovaná metodika 40/2014, VÚVeL.
Smith R.L., Schukken Y.H., Pradhan A.K., Smith J.M., Whitlock R.H., Van Kessel J.S., Wolfgang D.R., & Gröhn Y.T. (2011). Environmental contamination with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in endemically infected cattle. Preventive Veterinary Medicine, 102(1), 1–9. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.06.009
Smith R.L., Schukken Y.H., & Gröhn Y.T. (2015). A new compartmental model of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection dynamics in cattle. Preventive Veterinary Medicine, 122(3), 298–305. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.10.008.
Stabel J.R, & Bannantine J.P. (2021) Reduced tissue colonization of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in neonatal calves vaccinated with a cocktail of recombinant proteins. Vaccine, 39(23). 3131–3140. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.04.051
Sweeney R.W., Whitlock R.H., & Rosenberger A.E. (1992). Mycobacterium paratuberculosis cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. Journal of Clinical Microbiology, 30(1), 166–171. https://doi.org/10.1128/jcm.30.1.166-171.1992
Sweeney R.W., Collins M.T., Koets A.P., McGuirk S.M., & Roussel A.J. (2012). Paratuberculosis (Johne's disease) in cattle and other susceptible species. Journal of Veterinary Internal Medicine, 26(6), 1239–1250. https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2012.01019.x
Vansnick E., de Rijk P., Vercammer F., Geysen D., Rigouts L., & Portaels F. (2004). Newly developed primers for the detection of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis. Veterinary Microbiology 100(3-4), 197–204. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.02.006
Whittington R.J., & Windsor P.A. (2009). In utero infection of cattle with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: A critical review and meta-analysis. The Veterinary Journal, 179(1), 60–69. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.08.023
Whittington R.J., Begg D.J., de Silva K., Purdie A.C., Dhand N.K., & Plain K.M. (2017). Case definition terminology for paratuberculosis (Johne's disease). BMC Veterinary Research, 13(1), 328. https://doi.org/10.1186/s12917-017-1254-6
Whittington R., Donat K., Weber M., Kelton D., Nielsen S.S., Eisenberg S., Arrigoni N., Just R., Saez J.L., Dhand N., Santi A., Michel A., Barkema H.W., Kralik P., Kostoulas P., Citer L., Griffin F., Barwell R., Moreira M.A.S., Slana I. et al. (2019). Control of paratuberculosis: who, why and how. A review of 48 countries. BMC Veterinary Research, 15(1), 198. https://doi.org/10.1186/s12917-019-1943-4
Windsor P.A., & Whittington R.J. (2010). Evidence of age susceptibility of cattle to Johne's disease. The Veterinary Journal, 184(1), 37–44. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.01.007
Wiszniewska-Łaszczych A., Liedtke K., Szteyn J.M., & Lachowicz T. (2020). The effect of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection on productivity of cows in two dairy herds with low seroprevalence of paratuberculosis. Animals (Basel) 10(3),490. https://doi.org/10.3390/ani10030490
Wolf R., Barkema H.W., De Buck J., & Orsel K. (2015). Sampling location, herd size, and season influence Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis culture results. Journal of Dairy Science, 98(1), 275–287. https://doi.org/10.3168/jds.2014-8676
Yamamoto T., Murai K., Hayama Y., Kobayashi S., Nagata R., Kawaji S., Osaki M., Sakakibara S., & Tsutsui T. (2018). Evaluation of fecal shedding and antibody response in dairy cattle infected with paratuberculosis using national surveillance data in Japan. Preventive Veterinary Medicine, 149, 38–46. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.10.009
Zhang M.Z., & Zhang S. (2011) An efficient DNA extraction method for polymerase chain reaction-based detection of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in bovine fecal samples. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 23(1), 41–48. https://doi.org/10.1177/104063871102300106
Zoche-Golog V., Pützschel R., Einax E., & Donat K. (2021). Identification of different attitude towards paratuberculosis control using cluster analysis applied on data from an anonymous survey among German cattle farmers. Irish Veterinary Journal, 74 (1), 24. https://doi.org/10.1186/s13620-021-00204-3

PARATUBERKULÓZA V CHOVECH DOJENÉHO SKOTU

Autoři:
MVDr. Věra Fichtelová, Ph.D.
MVDr. Kamil Kovařčík, Ph.D.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70, 621 00, Brno

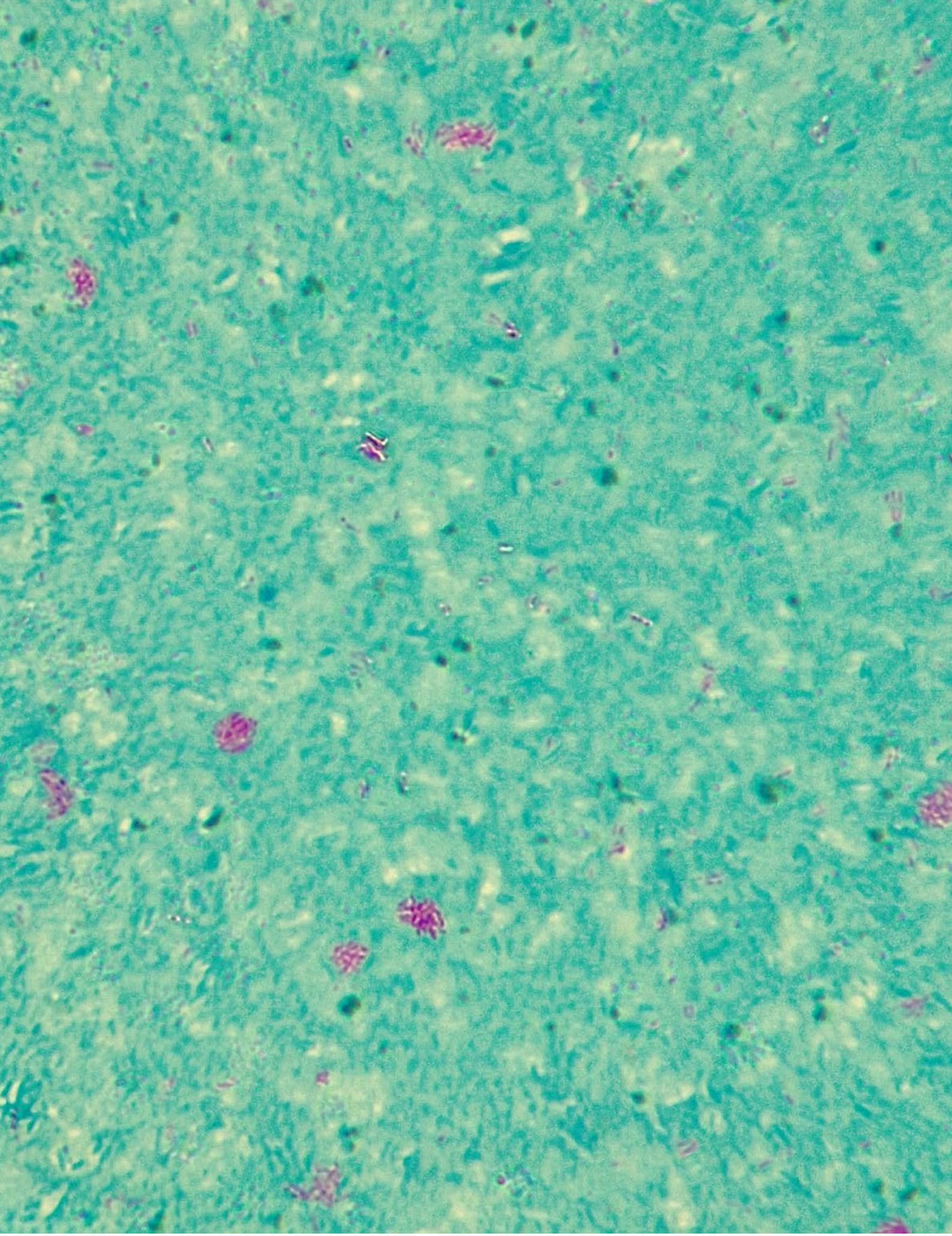
Vydavatel:
Zemědělský svaz ČR - Česká technologická platforma pro zemědělství

Grafika:
Pavla Brus Ortová

Tiskárna:
SYNERGIE: 4U s.r.o.

Vydání: první

Rok vydání: 2021

Náklad: 1000 výtisků

Za obsahovou a jazykovou správnost díla odpovídá autor.