

**JIHOČESKÁ UNIVERSITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

DISERTAČNÍ PRÁCE

VÝZNAM PARATUBERKULÓZY V CHOVECH DOJENÉHO SKOTU

MVDr. Lucie Hasoňová

2009

Školitel:

in memoriam

prof. MVDr. Jaroslav Kursá, DrSc.

Jihočeská universita v Českých Budějovicích

Zemědělská fakulta

Katedra anatomie a fyziologie hospodářských zvířat

prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.

Jihočeská universita v Českých Budějovicích

Zemědělská fakulta

Katedra anatomie a fyziologie hospodářských zvířat

Školitel specialista:

prof. MVDr. Ivo Pavlík, CSc.

Oddělení bezpečnosti potravin a krmiv

Výzkumný ústav veterinárního lékařství v Brně

Práce byla zpracována za podpory grantů:

IG 14/05: Význam paratuberkulózy v chovech mléčného skotu

FRVŠ 329/2007: Paratuberkulóza v chovech dojených plemen skotu

GA ČR 523/03/H076: Doktorandský grantový projekt pro podporu DSP

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně na základě vlastních zjištění a za pomoci uvedené literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své disertační práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vniklé vypuštěním vyznačných částí archivovaných Zemědělskou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

.....
MVDr. Hasoňová Lucie

V Českých Budějovicích
dne 30.9.2009

*Kdykoliv v nějaké věci najeznu myšlenku zdravější,
rád ustoupím od předešlé věda,
že co vím, jest jen nejmenší část toho,
co nevím.*

Jan Hus

OBSAH

	Abstrakt	
	Seznam zkratk	
	Poděkování	
1.	Úvod	12
2.	Literární přehled	13
2.1.	Ozdravování skotu od paratuberkulózy	13
2.1.1.	Eliminační metoda (test-and-cull)	14
2.1.1.1.	Původce paratuberkulózy v ejakulátu	15
2.1.1.2.	Původce paratuberkulózy a embryo transfer	15
2.1.2.	Chovatelská opatření proti paratuberkulóze	15
2.1.2.1.	Organizace odchovu telat z hlediska prevence infekce	16
2.1.2.2.	Význam kontaminace vnějšího prostředí	16
2.1.2.3.	Nákup zvířat a rizika zavlečení paratuberkulózy do chovu	17
2.1.2.4.	Vliv výživy na průběh paratuberkulózy	17
2.1.2.5.	Paratuberkulóza u volně žijících přežvýkavců	17
2.1.3.	Vakcinace proti paratuberkulóze	18
2.1.4.	Léčba paratuberkulózy	18
2.1.5.	Genetické nástroje při tlumení paratuberkulózy	19
2.1.6.	Certifikační programy	19
2.1.7.	Ozdravování chovů v České republice	20
2.2.	Význam paratuberkulózy	21
2.2.1.	Význam paratuberkulózy z chovatelského hlediska	21
2.2.1.1.	Negativní energetická bilance (NEB)	22
2.2.1.2.	Narušená buněčná imunita	22
2.2.1.3.	Vliv paratuberkulózy na mléčnou produkci	22
2.2.1.4.	Vliv paratuberkulózy na mléčné komponenty	23
2.2.1.5.	Vliv paratuberkulózy na počty somatických buněk	23
2.2.1.6.	Vliv paratuberkulózy na plodnost	23
2.2.1.7.	Zvýšená predispozice k jiným onemocněním	24
2.2.2.	Ekonomický význam paratuberkulózy	25
2.2.2.1.	Ekonomika zdraví obecně	25
2.2.2.2.	Ekonomické konsekvence paratuberkulózy	25

2.2.2.3.	Klasifikace ekonomických ztrát	26
2.2.2.4.	Předčasné vyřazování, úhyny a náklady na obnovu stáda	28
2.2.2.5.	Náklady na realizaci ozdravovacích programů	28
2.2.2.6.	Exportní a importní omezení	30
2.2.2.7.	Ztráty vznikající na úrovni jednotlivých farem a na úrovni státu	30
2.2.2.8.	Sociální aspekt paratuberkulózy	31
2.3.	Diseminace původce paratuberkulózy ve tkáních a jeho vylučování do mléka	32
3.	Cíle	34
4.	Materiál a metody	35
4.1.	Modelové chovy – historie a obecná charakteristika	35
4.2.	Metody ozdravování sledovaných chovů	37
4.3.	Odběr vzorků orgánů, výkalů, mléka a vnějšího prostředí	38
4.4.	Použité metody diagnostiky paratuberkulózy	41
4.4.1.	Kultivační vyšetření	41
4.4.2.	Molekulární metody	43
4.5.	Věkové kategorie zvířat v chovu S	43
4.6.	Zhodnocení produkčních a reprodukčních ukazatelů	43
4.7.	Statistická analýza	45
5.	Výsledky	46
5.1.	Tlumení nákazy v chovu S	46
5.1.1.	Průběh nákazy v chovu S	46
5.1.2.	Vzplanutí a suspektní diagnostika	46
5.1.3.	Laboratorní diagnostika paratuberkulózy	46
5.1.4.	Epizootologická analýza a posouzení rizik	48
5.1.5.	Tlumení paratubekulózy	48
5.1.6.	Postup radikální metody tlumení paratuberkulózy	48
5.1.7.	Výsledky laboratorních vyšetření	49
5.1.7.1.	Výsledky kultivace vzorků výkalů	51
5.1.7.2.	Výsledky kultivace vzorků orgánů	54
5.1.7.3.	Výsledky kultivace tkání plodů	57
5.1.7.4.	Výsledky kultivace vzorků mléka	57
5.1.7.5.	Výsledky kultivace vzorků vnějšího prostředí	57
5.1.7.6.	Výsledky molekulární analýzy původce paratuberkulózy	57

5.1.8.	Incidence infekce původcem paratuberkulózy u dojnic	57
5.1.9.	Epizootologická analýza	59
5.1.10.	Ekonomické konsekvence paratuberkulózy	59
5.1.10.1.	Náklady na diagnostiku a veterinární zákroky	59
5.1.10.2.	Snížení jatečné hodnoty zvířat	60
5.1.10.3.	Ztráty ušlého zisku	61
5.1.10.4.	Náklady na náhradu vyřazených zvířat	61
5.1.10.5.	Obchodní omezení a ztráta chovatelské hodnoty zvířat	61
5.1.10.6.	Náklady spojené s asanací stájových prostor	62
5.1.10.7.	Náklady spojené s asanací a obnovou pastevního areálu	62
5.1.10.8.	Náklady na likvidaci krmiv, steliva, chlévské mrvy	62
5.1.10.9.	Ovlivnění mléčné užitkovosti a reprodukční výkonnosti	63
5.1.10.10.	Zvýšená incidence jiných onemocnění	64
5.1.11.	Zhodnocení ozdravovacího programu	67
5.2.	Tlumení nákazy v chovu C	67
5.2.1.	Průběh nákazy v chovu C	67
5.2.2.	Vzplanutí nákazy a suspektní diagnostika	68
5.2.3.	Laboratorní diagnostika	68
5.2.4.	Epizootologická analýza a posouzení rizik	68
5.2.5.	Eliminační metoda tlumení paratuberkulózy	69
5.2.5.1.	Závady v dodržování ozdravovacího postupu	69
5.2.6.	Výsledky laboratorních vyšetření	69
5.2.6.1.	Výsledky kultivace vzorků výkalů	69
5.2.6.2.	Výsledky kultivačního a PCR vyšetření vzorků mléka	72
5.2.6.3.	Výsledky kultivace vzorků vnějšího prostředí	72
5.2.7.	Význam paratuberkulózy	73
6.	Diskuse	79
7.	Shrnutí a závěry	97
	<i>Postskriptum</i>	<i>101</i>
8.	Literatura	103
9.	Seznam publikací	119

ABSTRACT

Paratuberculosis (Johne's disease) is a chronic disease of ruminants with a long incubation period (up to several years) caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*MAP*).

Worldwide, Johne's disease causes great losses, particularly for milk producers (Gill, 1989; Ott et al., 1999).

Infection is most commonly transmitted by faeces, contaminated milk and faeces-contaminated feed and water (Sweeney, 1996). *In utero* transmission represents another important possibility and should be considered in the control of the disease.

Although the gastrointestinal tract is means as the primary site of infection, in particular the mucosa of the ileo-caecal junction including the adjacent mesenteric lymph nodes, *MAP* dissemination to extraintestinal tissues (such as mammary tissues, liver, spleen, kidney, heart, reproductive tract) has been also documented.

The objectives of this study were to investigate distribution of *MAP* in various tissues, in faeces and in milk samples from 131 animals originating from one imported Jersey cattle herd from Denmark.

MAP was detected by culture in 37.4 % animals. Massive *MAP* growth was most often observed in the small intestines (98.0 %). The lowest levels of *MAP* were found in spleen and mammary gland samples. *MAP* was detected in the faeces of 8.4 % animals.

The highest prevalence of *MAP* infection (42.9 %) was in age Group B (1.6 to 3 years) and the lowest (6.1 %) in Group D (more than 8 years). Seven positive young animals were detected, one of them was less than one month of age, which could imply an intrauterine infection. *MAP* shedding in faeces by a five-month-old calf was also confirmed.

The IS900 RFLP type B-C1 was identified in all investigated samples of tissues.

In other partially imported Holstein herd, prevalence of infection was evaluated on the basis of fourteen culture examinations of faeces originating from all animals older than 18 months, nearly 3000 samples was investigated. At the beginning prevalence of *MAP* infection was more than 10 % in this herd and then it was considerably reduced.

In both dairy herds in our study milk samples were investigated by culture. No *MAP* positive milk samples were detected which can be explained by intermittent shedding of *MAP* and the presence of low numbers of viable *MAP* cells in milk.

We found considerable economic impacts of paratuberculosis caused from culled positive animals, replacement cost, diagnostics etc.

SEZNAM ZKRATEK

AST	acido-alkohol stabilní tyčky
CFU	colony forming units
ČR	Česká republika
ELISA	Enzyme linked immunoassay
HPC	hexadecyl pyridinium chloride
IDT	imunodifúzní test
IS	inzerční sekvence
KVS	Krajská veterinární správa
LAM	lipoarabinomannan antigen
LN	mízní uzlina
M	sliznice
MPN	migrace polymorfonukleárních neutrofilů
MAP	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>
Mze ČR	Ministerstvo zemědělství České republiky
NEB	negativní energetická bilance
OIE	Mezinárodní úřad pro nákazy zvířat
PCR	Polymerase Chain Reaction
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RVK	reakce vazby komplementu
SP	servis perioda
subsp.	subspecies
SVS ČR	Státní veterinární správa České republiky
USD	United States dollars
VÚVeL	Výzkumný ústav veterinárního lékařství v Brně
Z-N	Ziehl-Neelsen

PODĚKOVÁNÍ

Drahému prof. MVDr. Jaroslavu Kursovi, DrSc. vyjadřuji své poděkování za cestu, kterou mi ukázal, za slova útěchy i povzbuzení, za četná vyprávění plná životních moudrostí a poučení i za veselé chvíle; za pokoru, které mě učil ...i lítost nad tím, že spolu již nezajdeme ke Třem Sedlákům.

Ráda bych poděkovala prof. MVDr. Miroslavu Tomanovi, CSc. a prof. Ivo Pavlíkovi, CSc. za umožnění získání podkladů a cenných zkušeností k vypracování této disertační práce v nadstandardních podmínkách laboratoří Oddělení bezpečnosti potravin a krmiv Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně.

Prof. Pavlíkovi děkuji za jeho pracovní entuziasmus, odborné rady, poučné služební cesty a zasvěcování do otázek mykobakteriálních infekcí.

Za pomoc při překonávání nelehkých (nejen) pracovních začátků děkuji upřímně Ing. Zdeňce Rozsypalové, paní Janě Šrytové, MVDr. Markétě Kopečné, Ph.D., Mgr. Vladimíru Beranovi a MVDr. Ivo Trčkoví, Ph.D. Zejména bych chtěla poděkovat Zdeňce a Ivošovi. Zdeňce, za její ochotu, láskyplnou účast a za to, že je taková, jaká je. Ivošovi děkuji za pomoc při odběrech a zpracování vzorků, za velmi zajímavé a mnohdy dobrodružné služební cesty, za dobře míněné rady a společně strávené časy.

Mé velké poděkování patří RNDr. Vladimíru Babákovi za zpracování statistických analýz, za jeho nekonečnou trpělivost, shovívavost a svěží nápady.

Za vstřícnost a stále připravené pomocné ruce děkuji srdečně paní sekretářce Romance Vlčnovské a pracovnícím knihovny – paní Zdeňce Gregorové a paní Anně Mašlaňové.

Za konzultace otázek týkajících se ekonomiky chovu skotu děkuji Ing. Stanislavu Staňkovi (Výzkumný ústav živočišné výroby, Praha - Uhřetěves).

Děkuji pracovišti Katedry veterinárních disciplín a kvality produktů ZF JU v ČB, jejímu vedoucímu prof. Ing. Janu Trávníčkovi, CSc. a děkanovi ZF prof. Ing. Miloslavu Šochovi, CSc.

Za kritické čtení této práce a cenné připomínky zůstávám vděčná Ing. Ludmile Landové, Ph.D. (Trombotické centrum, Praha) a Ing. Stanislavu Staňkovi.

Lidem, které jsem měla možnost během této práce poznat, za což jsem upřímně ráda, děkuji za jejich přátelství, pomoc v nesnázích a milá posezení - paní Pavle Vandasové, Ing. Ludmile Landové, Ph.D., Ing. Janě Šťastné, Romanovi, Liby, Elišce, Janovi, Kubovi...

Mé největší poděkování však náleží mým drahým rodičům a sestře, a také Jirkovi a jeho rodině, za pochopení a podporu, kterou pro mne vždy měli a mají.

1. ÚVOD

Před více než sto lety, v roce 1894, H.A. Johne a L. Frothingham poprvé popsali *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, původce onemocnění zvaného Johneho choroba (paratuberkulóza). Kochovy postuláty byly splněny F.W. Trowtem až v roce 1910.

Paratuberkulóza je popisována celosvětově a její ekonomické dopady jsou jak na individuální, tak na národní úrovni nemalé (Sweeney, 1996). V České republice byl až do roku 1989 její výskyt sporadický, poté, s liberalizací obchodu, došlo k rozšíření této nákazy do mnoha chovů mléčného i masného skotu (Pavlik a kol., 2000b).

Výzkumný ústav veterinárního lékařství v Brně (VÚVeL) jako první v České republice zahájil v roce 1983 kultivační vyšetření výkalů na původce paratuberkulózy (Pavlas a kol., 1997), výzkumné činnosti zaměřené na paratuberkulózu však začala být největší pozornost věnována až po roce 1989. Zavedené kultivační metody byly za uplynulých 20 let výzkumu propracovány a nově byly zavedeny a rozvinuty také metody molekulární biologie. Kupříkladu standardizovaná metoda polymorfismu délky restričních fragmentů (RFLP), umožňující typizaci jednotlivých izolátů *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, je široce nápomocná při epizootologických analýzách (Pavlik a kol., 1999b).

V České republice stáli na počátku 90. let jak veterinární lékaři, tak chovatelé skotu v otázce paratuberkulózy v podstatě na „startovní čáře“. Právě tento počáteční handicap, který byl postupem času eliminován pomocí pracovníků VÚVeL a nově nabytých praktických zkušeností, byl zřejmě jednou z příčin značného rozšíření této choroby v podmínkách českého zemědělství.

Ačkoliv bylo možné čerpat ze zahraničních publikací a zkušeností, vždy je třeba takovéto informace zužitkovat v konkrétních, často velmi speciálních, podmínkách a vytvářet tak zkušenosti vlastní. Společné úsilí výzkumných pracovníků, epizootologů, praktických veterinárních lékařů a chovatelů skotu přineslo nové poznatky v oblasti cest šíření paratuberkulózy v České republice, diagnostiky této choroby a zavádění chovatelských opatření, bránících jejímu dalšímu šíření v chovu i mezi chovy.

I když od prvního popisu původce paratuberkulózy uplynulo již mnoho desítek let, lze říci, že zájem o paratuberkulózu je vysoký a stále zůstává řada nezodpovězených otázek a úkolů v jejím výzkumu. Odpovědi na některé z těchto otázek se snaží poskytnout i tato práce.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

Paratuberkulóza je v současné době považována za jedno z nejčastějších a zároveň nejdražších chronických bakteriálních onemocnění přežvýkavců (Kennedy a Benedictus, 2001). Závažné ekonomické důsledky má toto onemocnění především v chovech dojeného skotu (Hasonova a Pavlik, 2006).

Původce paratuberkulózy, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), je pomalu rostoucí, acidoalkoholrezistentní tyčinka obsahující specifickou inzertní sekvenci IS900 (Sweeney, 1996). Z epizootologického hlediska je významná schopnost původce dlouhodobě přežívat ve vnějším prostředí (Chiodini a Van Kruiningen, 1986).

K infekci jsou nejvýmavější mladí jedinci do věku šesti měsíců. Primárním zdrojem MAP je výkaly infikovaných zvířat kontaminované prostředí, v němž jsou telata chována a kontaminované krmivo, jež má za následek pozření původce (Sweeney, 1996). Bylo také prokázáno vylučování MAP kolostrem a mlékem infikovaných matek a infekce plodu *in utero*. Dalšími možnými zdroji infekce jsou: ejakulát infikovaných býků (Ayele a kol., 2004), embryotransfery (Rhode a Shulaw, 1990) a divocí přežvýkavci (Machackova-Kopecna a kol., 2005).

Paratuberkulóza je do stáda skotu obvykle zavlečena nákupem infikovaného, avšak klinicky bezpříznakového jedince. Vzhledem k velmi dlouhé inkubační době (Wells a Wagner, 2000) se nemusí u infikovaných zvířat i několik let objevit klinické projevy onemocnění. Znalosti zdrojů původce a způsobů přenosu infekce jsou nezbytným předpokladem jednak pro ochranu chovu před zavlečením infekce a dále také pro zahájení ozdravovacích programů a jejich úspěšné vedení.

Paratuberkulóza je u skotu, podobně jako u jiných přežvýkavců, charakterizována chronickou, granulomatózní enteritidou, která má za následek profúzní, léčbou neovlivnitelný průjem a progresivní ztrátu hmotnosti, eventuálně úhyn (Ott a kol., 1999).

V poslední době velmi diskutovanou otázkou vztahující se k paratuberkulóze, je její možný vztah ke Crohnově nemoci u lidí (Hermon-Taylor a kol., 2000).

2.1. Ozdravování skotu od paratuberkulózy

Ozdravování chovů skotu od paratuberkulózy je dlouhodobý a náročný proces (Kennedy a Benedictus, 2001), který je limitován dlouhou inkubační dobou onemocnění a některými

vlastnostmi původce onemocnění, např. jeho schopností dlouhodobě přežívat v prostředí, extrémně pomalým růstem či v některých případech dokonce neschopností růstu *in vitro*, na kultivačních půdách a širokým spektrem hostitelů (Chiodini a Van Kruiningen, 1986; Cetinkaya a kol., 1997). V neposlední řadě je celý proces ozdravování komplikován nedokonalostí používaných diagnostických testů, spočívající zejména v omezené senzitivitě, ale také v pracnosti, časové náročnosti a v jejich finanční náročnosti (Koets a kol., 2000).

Kontrolní program pro paratuberkulózu vyžaduje individuální plán pro každý chov skotu, který svou specifikou musí vycházet z konkrétních podmínek (Wells a Wagner, 2000). Pro výběr vhodného postupu ozdravování je v první řadě nezbytné zjištění prevalence paratuberkulózy v chovu (Gay a Sherman, 1992).

Pro stáda skotu prostá paratuberkulóza je prvotní metodou prevence vyvarování se zavlečení infikovaného zvířete do chovu, nejlépe uzavřeným obratem stáda. V případě nákupu zvířat je nezbytné jejich pečlivé testování (Wells a Wagner, 2000).

V České republice se při řešení paratuberkulózy donedávna vycházelo z Metodického návodu SVS ČR č. 6/2001 „Paratuberkulóza“. Metodický návod č. 6/2001 navrhoval využít ke zdolání této nákazy v chovu radikální nebo eliminační metodu. Je nutné dodat, že účinný ozdravovací program je vždy nutno přizpůsobit podmínkám konkrétního chovu a možnostem chovatele (Pavlik a kol., 1994).

2.1.1. Eliminační metoda (test-and-cull)

Eliminační metoda (test-and-cull) je založena na prevenci šíření původce, a to vyřazováním infikovaných jedinců a vhodně aplikovanými chovatelskými opatřeními (Gay a Sherman, 1992; Collins a Sockett, 1993). Délka trvání a účinnost celého procesu je ovlivněna zejména použitými diagnostickými metodami (Kreeger, 1991), které poskytují v diagnostice paratuberkulózy pouze omezenou senzitivitu a specifitu (Koets a kol., 2000).

Zvláště důležité při ozdravování chovů je okamžité vyřazování jedinců s klinickými projevy paratuberkulózy z důvodu zamezení kontaminace prostředí (McCaughan, 1989), neboť množství zárodků vylučovaných výkaly těchto zvířat může být velmi vysoké (Chiodini a kol., 1984).

Aktuelně diskutovanou otázkou je riziko využití ejakulátu a embryotransferu u skotu, případně jejich možný význam z hlediska šíření původce paratuberkulózy.

2.1.1.1. Původce paratuberkulózy v ejakulátu

Byla prokázána izolace *MAP* z přídatných pohlavních žláz a ejakulátu býků (Larsen a kol., 1981; Buergelt a kol., 2004; Herthnek a kol., 2006).

Ačkoliv možnost přenosu původce paratuberkulózy *per uteri* nebyla zcela prozkoumána (Eppleston a Whittington, 2001), není vyloučeno potenciální riziko přenosu prostřednictvím inseminace do stád s negativním infekčním statutem.

Je proto doporučeno využívat k umělé inseminaci pouze býky z chovů prostých paratuberkulózy a ejakuláty býků s klinickými příznaky paratuberkulózy zásadně vyloučit z využití (Gay a Sherman, 1992; Sockett, 1996). Herthnek a kol. (2006) uvádí, že býci bez klinických příznaků onemocnění mohou být nosiči *MAP* a tedy riziko, že ejakulát je infikován, přetrvává.

2.1.1.2. Původce paratuberkulózy a embryotransfer

Jsou k dispozici studie o existujícím nebezpečí přenosu *MAP* embryotransferem (Kruip a kol., 2003; Bielanski a kol., 2006; Perry a kol., 2006). Závěry všech tří studií jsou v podstatě shodné – riziko přenosu *MAP* prostřednictvím embryí při embryotransferu je velmi nízké, zvláště pokud jsou embrya ošetřena dle standardních mezinárodně platných metod (Mezinárodní společnost pro embryotransfer).

Kruip a kol. (2003) se domnívají, že přenos *MAP* do embryí je možný až v pozdějších fázích gravidity, nejdříve však kolem 60. dne po zabřeznutí, kdy je již vyvinuto fetomaternální spojení.

Z uvedeného je zřejmé, že největší potenciální riziko z hlediska přenosu původce paratuberkulózy představují krávy-příjemkyně embrya s neznámým infekčním statutem (Sockett, 1996).

2.1.2. Chovatelská opatření proti paratuberkulóze

Cílem managementu je řada kroků a opatření, která vedou k redukcí původce v prostředí, zamezení kontaminace vody a krmiva a tím následně k omezení či zabránění přenosu *MAP* k vnímavým zvířatům.

Opatření doporučovaná k prevenci paratuberkulózy tvoří významnou součást každého kontrolního programu. Přímou ovlivňují míru přenosu *MAP* v chovu (Dorshorst a kol., 2006) a tedy jejich zlepšení představuje zásadní prioritu v kontrolním programu každého stáda.

Harris a Barletta (2001) tato opatření považují dokonce za nejužitečnější nástroj při kontrole paratuberkulózy v chovech skotu i ostatních přežvýkavců.

2.1.2.1. Organizace odchovu telat z hlediska prevence infekce

Organizace odchovu telat je klíčovým principem a předpokladem úspěchu kontrolních programů (McCaughan, 1989).

Chovatelská opatření zde spočívají především v uplatňování hygienických zásad při porodech (čisté dezinfikované porodní boxy), časnou separaci telat od matek po narození – někteří autoři akceptují oddělení telete od matky nejpozději do 12 hodin po narození (McCaughan, 1989; Kennedy, 2007); jiní autoři doporučují okamžitý přesun (Gay a Sherman, 1992). Nemocná zvířata nesmí být chována v prostorech, kde probíhají porody (Merkal, 1984; Rossiter a Burhans, 1996). Zcela nepřijatelné je používání stejných pomůcek při krmení telat, při manipulaci s podestýlkou a dalšími materiály, které mohou být kontaminovány výkaly dospělých jedinců (Ayele a kol., 2001).

Velmi častým způsobem přenosu *MAP* v neonatálním období je pozření kontaminovaného krmiva nebo napájecí vody (Julian, 1975). Proto je nezbytné zabránit kontaktu telat se staršími zvířaty a s krmivem, vodou nebo podestýlkou kontaminovanou jejich výkaly (Hutchinson, 1988). Kolostrum a mléko infikovaných krav nesmí být používáno ke krmení telat. K napájení telat je vhodné využívat kvalitní komerční mléčnou náhražku nebo pasterizované mléko z daného chovu (Merkal, 1984).

Telata infikovaných matek představují rizikový faktor pro stádo, tudíž se jejich další využívání v chovu zásadně nedoporučuje (Gay a Sherman, 1992).

2.1.2.2. Význam kontaminace vnějšího prostředí

Nejběžnějším modelem přenosu infekce je cestou kontaminace prostředí, krmiv a vodních zdrojů výkaly infikovaných jedinců. Zvířata s klinickým onemocněním mohou vylučovat 10^6 až 10^{10} CFU/g výkalů a tím silně zamořovat vnější prostředí (Hulten a kol., 2001; Whittington a Sergeant, 2001). Je proto nutné zabránit možné kontaminaci krmiva a vody a omezit tak šíření *MAP* výkaly do prostředí vnímavých zvířat.

McCaughan (1989) ve své práci definuje některá opatření snižující kontaminaci prostředí, např. kontaminovaná místa vystavovat slunečnímu záření; hlubokou orbou podpořit rozptýlení

MAP v půdním profilu; drenážemi zajistit odtok vod; čištěním obuvi a dezinfekcí eliminovat přenos.

Hnůj, kejda a močůvka nesmí být používány na pastviny, které slouží k pastvě mladých kategorií skotu minimálně 1 rok před spásáním porostu nebo jeho zkrmováním (Gay a Sherman, 1992).

2.1.2.3. Nákup zvířat a rizika zavlečení paratuberkulózy do chovu

Z dlouhodobého hlediska je při kontrole paratuberkulózy nejvýznamnější prevence jejího šíření z infikovaných do neinfikovaných chovů (Julian, 1975). Dominujícím kritériem je způsob organizace chovu (Collins a kol., 1994).

Za nejvýhodnější a obecně doporučovaný je považován uzavřený obrat stáda (McCaughan, 1989; Sockett, 1996; Wells a Wagner, 2000).

Nakupovat zvířata lze pouze z chovů prostých paratuberkulózy (Gay a Sherman, 1992). Merkal (1984) označuje za paratuberkulózy prosté takové stádo, u něhož byla provedena tři bakteriologická vyšetření výkalů v intervalu 6 až 12 měsíců nebo ELISA testování dospělých jedinců s negativními výsledky.

2.1.2.4. Vliv výživy na průběh paratuberkulózy

Vztah nutričních poměrů ke klinické paratuberkulóze studovali Cetinkaya a kol. (1997), kteří zjistili spojitost mezi výskytem klinických forem choroby a některými koncentrovanými krmivly. Zakoupená hrubě mletá směs byla spojena s významně nižším rizikem onemocnění.

Význam adekvátní výživy zvláště v časném období života telat je permanentně zdůrazňován a včetně optimalizace výživových norem je popisován jako stimulační faktor v redukci incidence paratuberkulózy (Doyle, 1956; Julian, 1975; McCaughan, 1989; Cetinkaya a kol., 1997). Role specifických diet v kontrole této choroby je předmětem zkoumání.

2.1.2.5. Paratuberkulóza u volně žijících přežvýkavců

Paratuberkulóza postihuje také populaci volně žijících a farmově chovaných přežvýkavců. Cetinkaya a kol. (1997) uvádí přítomnost farmových jelenů na pozemcích společně s dojeným skotem jako faktor zvyšující riziko paratuberkulózy u dojeného skotu.

V případě paratuberkulózy není snadné (či možné) přijmout klasické metody kontroly, jakými jsou vakcinace a léčba. Důvody se v následujících odstavcích snažíme přiblížit.

2.1.3. Vakcinace proti paratuberkulóze

Využití vakcinace v procesu eradikace paratuberkulózy je považováno za kontroverzní.

Nicméně jsou k dispozici údaje charakterizující vakcinaci jako důležitou součást kontrolních strategií s využitím omezeným pouze u novorozených jedinců (rozmezí 1 až 35 dní života; Gay a Sherman, 1992). Shodné názory prezentují také van Schaik a kol. (1996), kteří vakcinaci proti paratuberkulóze označují za ekonomicky přínosnou.

Podle některých autorů vakcinace proti paratuberkulóze redukuje počet zvířat s klinickým onemocněním, avšak nechrání je proti infekci a ani nezabraňuje vylučování původce (Larsen a kol., 1978; Merkal, 1984; Hill, 1989; Wentink a kol., 1994; Goodger a kol., 1996; Koets a kol., 2000; Rosseels a Huygen, 2008). Vakcíny poskytují v případě paratuberkulózy pouze částečnou ochranu.

Významným negativním aspektem vakcinace proti paratuberkulóze je postvakcinační pozitivita některých zvířat na tuberkulin, takže tato při tuberkulinaci reagují pozitivně a mohou také vykazovat pozitivní reakce v sérologických testech na paratuberkulózu (Larsen a kol., 1978; Gay a Sherman, 1992; Muskens a kol., 2002; Rosseels a Huygen, 2008). Tato skutečnost komplikuje diagnostické programy tuberkulózy a svou interferencí znemožňuje využití sérologických testů k vyhodnocení prevalence paratuberkulózy ve stádě.

2.1.4. Léčba paratuberkulózy

Paratuberkulóza je prakticky neléčitelné onemocnění (Wells a Wagner, 2000). Terapie je zmiňována jen vyjimečně, především u zvířat s mimořádně vysokou genetickou hodnotou (St.Jean a Jernigan, 1991; St.Jean, 1996).

K terapii se používá kombinace antibiotik. Volbu zahrnuje isoniazid, rifampin, streptomycin, amikacin, kanamycin, ethambutol, clofazimine, dapsone a některá aminoglycosidová antibiotika (St.Jean, 1996). Za nejefektivnější považuje St.Jean (1996) kombinaci isoniazidu a rifampinu s důrazem na realizaci zákroku v časných stádiích choroby.

Léčba je založena na denní medikaci po velmi dlouhé období, vyúsťující spíše ve zmírnění choroby než v definitivní vyléčení (St.Jean a Jernigan, 1991). Příčinou omezeného efektu léčby

antibiotiky je pravděpodobně limitovaná penetrace účinných látek do tkání, které jsou *in vivo* osídleny mykobakteriemi (Cocito a kol., 1994).

2.1.5. Genetické nástroje při tlumení paratuberkulózy

Ve studiích o patogenezi *MAP* je často vyslovován předpoklad o spoluúčasti genetických faktorů zodpovědných za vnímavost nebo rezistenci k *MAP*. Rozvoj a využití genetických nástrojů spolu s ostatními kontrolními metodami by tedy mohlo být nápomocné v eradikaci paratuberkulózy.

Gonda a kol. (2006) tvrdí, že paratuberkulóza je vhodnou indikací pro genetickou selekci vzhledem ke skutečnosti, že se jedná o neléčitelné onemocnění a efektivní vakcína dosud není k dispozici.

Studiem heritability vnímavosti k paratuberkulóze se zabývalo více autorů. Výsledky jejich prací se liší v závislosti na použitých diagnostických metodách. Koets a kol. (2000) na základě postmortální diagnostiky určil heritabilitu vnímavosti k infekci 0,06. Metoda postmortální diagnostiky je sice relativně přesná, avšak pro běžnou diagnostiku nepraktická.

Mortensen a kol. (2004) odhadl s pomocí metody ELISA v mléce heritabilitu 0,102. Gonda a kol. (2006) využili metodu ELISA v séru, kultivace výkalů a kombinace obou metod s výslednými hodnotami: pro ELISA metodu 0,159, kultivaci výkalů 0,153 a při kombinaci metod 0,102. Ačkoliv ve všech těchto studiích byla odhadnuta pouze nízká heritabilita, bylo potvrzeno, že vnímavost k *MAP* infekci je geneticky fixovaná (Gonda a kol., 2006).

Koets a kol. (2000) zastávají názor, že výzkum heritability vnímavosti prohloubí poznatky o patogenezi paratuberkulózy a může pomoci k identifikaci genetických markerů rezistence.

V očekávaných výsledcích lze spatřovat nadějnou perspektivu dostupnosti metod a postupů, využitelných v selekčních programech orientovaných na rezistenci k této chorobě.

2.1.6. Certifikační programy

Certifikační programy, uplatňované např. v Holandsku a v některých státech USA (př. Wisconsin), představují praktické návody, jak řešit problematiku paratuberkulózy nikoliv pouze v jednotlivých stádech, ale plošně.

Principem je v podstatě garance stáda prostého paratuberkulózy a tedy ochrana chovatelů masného nebo dojeného skotu, kteří kupují chovná zvířata. Od certifikačního programu se očekává, že poskytne přehled o infekčním statutu jednotlivých stád jak pro chovatele, tak pro

obvodní veterináře a epizootology. Ve státech, v nichž je uplatňován, je založen na dobrovolnosti chovatelů s jasným cílem – dosáhnout nejlepší certifikační úrovně, tedy stáda s negativními výsledky testů a tím lepší ekonomickou prosperitou svého chovu. Lze odhadovat, že chovy prosté paratuberkulózy budou zvýhodněny při prodeji mléka a chovných, popř. jatečných zvířat. Byli to právě chovatelé masného a dojeného skotu, kupující či prodávající chovná zvířata, kteří již v 80. letech minulého století projevíli zájem o vývoj jednotného programu, který by poskytl rozumnou záruku za stáda prostá paratuberkulózy*.

Certifikační program stanoví, že všechna zvířata ve věku 24 měsíců a starší musí být každoročně testována (Sockett, 1996). U přikupovaných zvířat se vyžaduje negativní sérologický test před jejich zařazením do stáda, vyšetření výkalů musí být dokončeno nejpozději do 15 dní po zařazení. Testování zvířat se provádí v intervalu 14 měsíců. Na základě výsledků vyšetření je stádo zařazeno do příslušné certifikační úrovně.

Stádo, které není testováno na přítomnost původce paratuberkulózy, získává automaticky nejhorší certifikační klasifikaci, neboť je hodnoceno jako stádo, představující pro ostatní chovatele vysoké riziko zavlečení paratuberkulózy do jejich stád (Sockett, 1996).

Těmito rigorózními stanovisky se certifikační program zásadně liší od našeho systému, podle kterého stáda, která nejsou testována, jsou považována za stáda bez paratuberkulózy (Hasoňová a kol., 2008).

2.1.7. Ozdravování chovů v České republice

Standard českého Metodického návodu SVS ČR „Paratuberkulóza“ (dříve 6/2001, nyní 5/2008) je adekvátní svému názvu. Konkrétní postup k ozdravování daného stáda je třeba vytvořit přesně „na míru“ dle podmínek chovu, finančních možností atd., ve spolupráci s epizootologem, popř. obvodním veterinářem. Nemělo by být opomíjeno, že paratuberkulóza je dle OIE stále řazena mezi nákazy listu B, tedy nákazy s ohlašovací povinností.

Také ve státech se zavedenými certifikačními programy platí obecná protinákazová pravidla, např. přesun zvířat pouze do stád se stejnou či horší nálezovou situací.

Značným problémem v našich podmínkách bývá neochota chovatelů ke spolupráci při diagnostice paratuberkulózy, v níž jsou spatřována pouze úskalí spojená s různými omezeními. Této situaci by mohlo napomoci objasnění otázek souvisejících se státní podporou systematického programu tlumení nákazy v České republice.

* prof.Pavlík, osobní sdělení, 2005

V České republice existoval do 4. března 2008 program pro tlumení paratuberkulózy. Infikovaná stáda skotu byla v letech 1998 až 2008 ozdravována na základě kultivací výkalů odebíraných v intervalech 5 až 7 měsíců u všech zvířat starších 18 měsíců (Pavlik a kol., 2000b; Anon., 2001). V případě neúspěšného ozdravování byla stáda s vysokou prevalencí klinických případů (nad 10 % zvířat za rok) radikálně likvidována.

V současné době je veškerá činnost spojená s tlumením paratuberkulózy podle Metodického návodu SVS ČR č. 5/2008 ponechána v rukou chovatelů a chovatelských svazů.

2.2. Význam paratuberkulózy

2.2.1. Význam paratuberkulózy z chovatelského hlediska

Mléčný výnos a reprodukční výkonnost hrají zásadní roli pro posouzení ziskovosti chovu dojeného skotu (Arbel a kol., 2001).

V přímé souvislosti se zvyšujícími se nároky na potravinovou základnu, doprovází celou historii chovu hospodářských zvířat neustálá tendence ke zvyšování užitkovosti. Zvláště za několik posledních desetiletí došlo k výraznému zvýšení výnosu mléka, což s sebou ovšem nese také negativní důsledky, zejména v podobě zhoršující se plodnosti (Gröhn a Rajala-Schultz, 2000 ; López-Gatius, 2003; Wiltbank a kol., 2006), která je celosvětově pozorována. Vysoká mléčná produkce může vést ke vzniku negativní energetické bilance u některých (zvláště u rostoucích) zvířat, což může být příčinou rozvoje konkrétního onemocnění (Gröhn a Rajala-Schultz, 2000). Mléčná produkce významnou měrou ovlivňuje reprodukci. A naopak zhoršená reprodukční výkonnost redukuje mléčný výnos, počet narozených telat a může zvyšovat náklady na veterinární péči, inseminaci atd. (Gröhn a Rajala-Schultz, 2000).

Tyto ukazatele představují pro chovatele důležité vodítka při rozhodování o vyřazování zvířat z chovu.

Předpokládá se, že za zhoršení produktivity a za zvýšenou náchylnost k jiným nemocem u zvířat infikovaných *MAP* zodpovídají dva mechanismy. Jedním z nich je negativní energetická bilance, druhým mechanismem je narušení celulární imunity (Johnson-Ifearulundu a Kaneene, 1997).

2.2.1.1. Negativní energetická bilance (NEB)

Negativní energetická bilance je situace, kdy příjem energie z krmiva je nižší než-li potřeba této energie pro organismus (Vandehaar a kol., 1995).

U krav infikovaných paratuberkulózou se, vzhledem ke snížené absorpci živin ve střevě, předpokládá vyšší pravděpodobnost vzniku NEB. Mimo malabsorpčního syndromu dochází u paratuberkulózy (= granulomatózní enteritida) také ke ztrátám proteinů střevem (jinými slovy – enteropatie se ztrátou proteinů; Kreeger, 1991).

Spojitost mezi tímto patologickým procesem a pozorovanou redukcí využití krmiva, mléčné produkce, produkce mléčného tuku a proteinu a porážkové hmotnosti zvířat je zřejmá (Johnson-Ifearulundu a Kaneene, 1997).

Zvýšené riziko vzniku NEB nejen u infikovaných, ale také u neinfikovaných jedinců je v období krátce po otelení, kdy je zahájena mléčná produkce a dochází k jejímu prudkému nárůstu (Johnson-Ifearulundu a kol., 2000).

2.2.1.2. Narušená buněčná imunita

Byl popsán vztah mezi narušenou celulární imunitou a zvýšeným rizikem výskytu sekundárních onemocnění (Kreeger a kol., 1992).

Předpokládá se, že perzistence choroby v organismu může vyvolat neadekvátní buněčnou odpověď imunitního systému (Kreeger a kol., 1992; Kreeger a kol., 1991).

Kreeger a kol. (1991) zjistili, že monocyty u infikovaného skotu mají redukovanou odezvu na antigeny.

Spojitost mezi infekcí *MAP* a sníženou imunitní odezvou organismu může být podkladem zvýšené míry vyřazování z důvodu mastitid, neplodnosti a dalších zdravotních problémů (Johnson-Ifearulundu a Kaneene, 1997).

2.2.1.3. Vliv paratuberkulózy na mléčnou produkci

Paratuberkulóza je jedním z mnoha faktorů, které mohou způsobovat odchylky v mléčné produkci dojníc v rámci infikovaného stáda.

Dalšími faktory jsou genetický základ pro schopnost produkce mléka, dále faktory prostředí jako je management krmení a dojení a v neposlední řadě zdravotní stav mléčné žlázy a zdravotní stav celého organismu dojnice (Weigel a kol., 1993).

Byl prokázán vztah mezi produkčním potenciálem a pravděpodobností vyřazení z důvodu paratuberkulózy, kdy u vysoce produktivních krav infikovaných *MAP* byla zjištěna větší pravděpodobnost rozvoje klinického onemocnění v důsledku značné zátěže celého organismu (Benedictus a kol., 1987; McNab a kol., 1991b). Snížení mléčné produkce bylo popsáno v několika studiích a podle autorů bylo vyhodnoceno různými postupy a z různých hledisek (Hasonova a Pavlik, 2006). Bylo zdokumentováno, že paratuberkulóza snižuje mléčnou produkci u infikovaných krav, jak s klinickými příznaky nemoci, tak u krav bez zjevných klinických projevů (Buergelt a Duncan, 1978; Abbas a kol., 1983; Whitlock a kol., 1985; Benedictus a kol., 1987; Johnson-Ifearulundu a kol., 1999; Ott a kol., 1999; Raizman a kol., 2007). Nicméně ztráty mléčné produkce popisované v těchto studiích se pohybují ve velmi širokém rozmezí, 2,2 až 25 %.

2.2.1.4. Vliv paratuberkulózy na mléčné komponenty

Informací, týkajících se mléčných složek ve spojení s paratuberkulózou, je málo, vzájemně se neshodují a tedy z nich nelze činit jasné závěry.

V některých studiích byl potvrzen negativní vliv infekce paratuberkulózou na množství mléčného tuku a proteinu (Collins a Nordlund, 1991; Sweeney a kol., 1994; Hendrich a kol., 2005), avšak v jiných signifikantní rozdíly v mléčných komponentech mezi infikovanými a neinfikovanými dojniciemi prokázán nebyl (Nordlund a kol., 1996; Johnson a kol., 2001; Tiwari a kol., 2007).

2.2.1.5. Vliv paratuberkulózy na počty somatických buněk

Vztah mezi *MAP*-infekcí a zvýšeným počtem somatických buněk nebyl zatím zcela prokazatelně potvrzen, a tudíž i chovatelské aspekty z tohoto vztahu vyplývající, nemají ucelený charakter.

Většina studií vliv paratuberkulózy na počty somatických buněk nepotvrdila (Spangler a kol., 1992; Chaffer a kol., 2002; Lombard a kol., 2005; Gonda a kol., 2007), některé studie naopak tento vztah prokázali (McNab a kol., 1991b; VanLeeuwen a kol., 2007).

2.2.1.6. Vliv paratuberkulózy na plodnost

Výzkumy zatím neprokázaly zcela zřejmou souvislost mezi paratuberkulózou a poruchami plodnosti (McKenna a kol., 2006). Přesto je paratuberkulóza jako jedna z možných příčin

snížené plodnosti u infikovaných krav zvažována již poměrně dlouhou dobu (Merkal a kol., 1975; Buergelt a Duncan, 1978; Johnson-Ifearulundu a kol., 2000).

Přesný patofyziologický základ zhoršené reprodukční výkonnosti není dosud znám. Jeden z možných mechanismů je založen na vztahu mezi výživným stavem plemence a její reprodukční výkonností. Bylo popsáno, že negativní energetická bilance (NEB) může zpomalovat růst a vývoj žlutého tělíska, což podmiňuje snížení hladiny sérového progesteronu (Vandehaar a kol., 1995). Podle Johnson-Ifearulundu a kol. (2000) by NEB u subklinických dojnic mohla mít za následek slabé projevy říje nebo prodloužení poporodního anestru. K NEB dochází, jak již bylo popsáno v předchozí podkapitole (2.2.1.1.) typicky v časném poporodním období, v důsledku zvyšování produkce mléka. Lze říci, že produkce je v tomto kritickém čase před reprodukcí upřednostněna (Johnson-Ifearulundu a kol., 2000).

Ačkoliv negativní vliv paratuberkulózy na reprodukční parametry byl některými autory prokázán (Abbas a kol., 1983; Körmendy a kol., 1989; Johnson-Ifearulundu a kol., 1996, 2000; Marcé a kol., 2007), existují i studie, jenž spojitost mezi paratuberkulózou a poruchami plodnosti nepotvrzují (de Lisle a Milestone, 1989; McNab a kol., 1991b; Chaffer a kol., 2002).

2.2.1.7. Zvýšená predispozice k jiným onemocněním

Narušená buněčná imunita u infikovaných zvířat může představovat riziko vzniku sekundárních onemocnění (Kreeger a kol., 1992).

Dotta a kol. (1999) popsali signifikantně nižší PMN* (po jejich stimulaci) u krav se subklinickou paratuberkulózou v porovnání s neinfikovanými zvířaty. Rozdíly v migrační aktivitě nestimulovaných buněk zjištěny nebyly. Autoři usuzují, že infekce působí negativně pouze na migrující buňky (Dotta a kol., 1999).

Asociace mezi paratuberkulózou a zvýšeným rizikem sekundárních onemocnění je popsána také dalšími autory (Johnson-Ifearulundu a kol., 1999; Kennedy a Benedictus, 2001). Naopak Tiwari a kol. (2007) vliv subklinické paratuberkulózy na vnímavost dojeného skotu k jiným onemocněním nepotvrdili.

* migrace polymorfonukleárních neutrofilů

2.2.2. Ekonomický význam paratuberkulózy

2.2.2.1. Ekonomika zdraví obecně

Přítomnost onemocnění obecně má za následek nižší výstupy v porovnání s očekávanými (např. nižší mléčné výnosy) a/nebo vyšší využití vstupů, např. veterinárních služeb (Bennett, 2003).

Přítomnost či absence určitého onemocnění nemá vliv pouze na produkci, ale působí také regulačně na ceny (jak výstupů, tak vstupů); např. při zvýšené potřebě vstupů v podobě veterinárních služeb při dozoru nad nějakým onemocněním, může dojít ke zvýšení produkce dobytka, což může mít postupně za následek nižší ceny těchto výstupů (Otte a Chilonda, 2000; Bennett, 2003; Losinger, 2005).

Bennett (2003) definoval náklady na řešení určitého onemocnění jako přímé náklady (C), podle vztahu:

$$C = (L + R) + T + P$$

Kde:

L = hodnota ztrát u očekávaného výstupu vyvolaná přítomností nějaké choroby

R = zvýšení nákladů na neveterinární prostředky (pracovní síly atd.)

T = hodnota vstupů použitých k léčbě

P = náklady na preventivní opatření proti dané chorobě

Výše citovaný autor nezahrnoval do svého modelu nepřímý vliv onemocnění; pouze některé z těchto vlivů popsal, např. vliv na zdraví lidí, pohodu zvířat (welfare), mezinárodní obchod atd.

Zhodnocení nákladů a případných ztrát, vznikajících ve spojitosti s jednotlivými chorobami, představuje hodnotnou ekonomickou informaci, jež poskytuje data pro rozhodování o použití kontrolních programů a o jejich efektivitě. V řadě studií jsou používány termíny „ekonomicky optimální úroveň choroby a její kontroly“, které jsou určeny cenami nutných vstupů a cenami produktů.

2.2.2.2. Ekonomické konsekvence paratuberkulózy

Ekonomické konsekvence plynoucí z paratuberkulózy jsou výsledkem předčasného vyřazování zvířat, nižší mléčné produkce a ztrát hmotnosti zvířat prodávaných k porážce (Wells

a Wagner, 2000), a tyto se mění v závislosti na regionu, kde se farma nachází (Riemann a Abbas, 1983). Mění se také v závislosti na produkčním systému, který je představován velikostí stáda, úrovní produkce, managementem chovu (především odchovem telat a mladých zvířat) a dalšími faktory (Dufour a kol., 2004). Jejich rozsah je dokonce ovlivňována i použitou diagnostickou metodou a významnou roli hraje také imunologický profil stáda (Körmendy a kol., 1989; Johnson-Ifeorunlu a kol., 2000).

Zatímco neblahé vlivy klinické paratuberkulózy na mléčnou užitkovost, kondici zvířat a předčasné vyřazování zvířat, již byly dobře popsány (Harris a Barletta, 2001; Chaffer a kol., 2002), specifické vlivy subklinické paratuberkulózy jsou zdokumentovány méně a mohou mít i protichůdné výsledky. Hlavní příčinu lze spatřovat v složitosti odhalování subklinicky nemocných jedinců vzhledem k omezené senzitivitě diagnostických testů (McKenna a kol., 2006). Možný vliv subklinické formy paratuberkulózy na produkci a reprodukci zvířat lze pouze odhadovat (Johnson-Ifeorunlu a Kaneene, 1997).

2.2.2.3. Klasifikace ekonomických ztrát

Ekonomické ztráty je možné hodnotit z několika pohledů (Benedictus et al., 1987; Ott a kol., 1999; Otte a Chilonda, 2000; Groenendaal a kol., 2005). Nejčastější je členění na ekonomické ztráty:

- (1) přímé a
- (2) nepřímé

(1) Přímé ekonomické ztráty

a. Největší ztráty jsou způsobeny úhynem klinicky nemocných zvířat a snižováním jatečné hodnoty nebo úplnou konfiskací vyřazovaných zvířat.

b. Zhoršení mléčné produkce jak z hlediska kvantitativního, tak kvalitativního, tedy změny mléčných parametrů, zvýšený počet somatických buněk a vyšší výskyt mastitid.

c. V důsledku nižšího zabřezávání a zvýšeného výskytu poporodních komplikací se zhoršuje plodnost krav ve stádu.

d. Nejenom u klinicky, ale také u subklinicky infikovaných zvířat dochází ke snížené schopnosti využití (konverze) krmiva.

e. U infikovaných zvířat dochází ke zkrácení produkčního věku.

f. V chovech infikovaných *MAP* byla zaznamenána zvýšená incidence jiných chronických onemocnění (chronické artritidy, ruminitidy, dermatitidy, mastitidy aj.).

(2) Nepřímé ekonomické ztráty

- a. Předčasné vyřazování zvířat způsobuje ztrátu jejich budoucí produkce.
- b. Zvýšené náklady na tzv. „neaktivní produkci“.
- c. Zvýšené náklady na obnovu stáda.
- d. Náklady na diagnostiku paratuberkulózy. V počátečním období může jít také o náklady na „zbytečnou“ léčbu subklinicky a klinicky nemocných zvířat (léčba chronického průjmu končícího u vysoce produkčních zvířat většinou jejich úhynem nebo utracením) a další léčebné úkony veterináře u zvířat vyřazovaných z chovu jako infikovaných.
- e. Náklady vynaložené na realizaci kontrolního programu.
- f. Ztráta potenciálu vysoce hodnotných zvířat, která jsou z chovu vyřazena jako podezřelá z infekce (např. potomci infikovaných matek).
- g. Náklady spojené s obchodními omezeními.
- h. V neposlední řadě je to dlouhodobé poškození pověsti podniku, v němž jsou chována infikovaná zvířata.

Tiwari a kol. (2008) a Windsdor a Whittington (2009) na tomto místě zmiňují také možný vliv *MAP* na zdraví lidí.

Stanovení nepřímých nákladů a produkčních ztrát vyplývajících z klinické a subklinické choroby je velmi náročné (Jones, 1989).

Dufour a kol. (2004) rozdělili ztráty způsobené paratuberkulózou do dvou skupin:

(1) Ztráty způsobené přítomností klinicky nemocných zvířat jsou vypočteny jako suma tvořená z následujících položek:

a) Největší položku představuje fyzická ztráta nemocné krávy a jejího telete. Chovatelské ztráty přitom vznikají především při nutnosti vyřazení telete-jalovičky, která je důležitá pro další chov. Býčci jsou vykrmováni do porážkové hmotnosti.

Výpočet těchto ztrát závisí na tom, kolik zvířat je z chovu vyřazeno a poté nahrazeno.

b) Další významnou položku tvoří náklady na úkony hrazené veterinárnímu lékaři a za laboratorní testy (barvení dle Ziehl-Neelsena, sérologické a kultivační vyšetření).

(2) Ztráty způsobené přítomností subklinicky infikovaných zvířat se, v porovnání s výpočtem ztrát při výskytu klinických případů, jen velmi obtížně vyhodnocují.

2.2.2.4. Předčasné vyřazování, úhyny a náklady na obnovu stáda

V chovu infikovaném paratuberkulózou se zvyšuje podíl úhynů zvířat a dále se zvyšuje počet zvířat předčasně vyřazovaných z důvodu infekce (klinické i subklinické).

U zvířat v dobrém zdravotním stavu a s normálním produkčním potenciálem se průměrné výnosy z mléčné užitkovosti zvyšují s věkem (Dijkhuizen a kol., 1985). Největší ekonomické ztráty jsou způsobeny nerealizací budoucího výnosu v důsledku předčasného vyřazování infikovaného skotu. Ztrátu z nerealizované produkce lze odhadnout podle věku, v němž dojde k vyřazení a produkčního potenciálu vyřazeného zvířete (Benedictus a kol., 1987).

Vysoce užitkové krávy jsou nejčastěji vyřazovány po první nebo druhé laktaci (Buergelt a Duncan, 1978), tedy v relativně mladém věku, před dosažením vrcholu svého produkčního potenciálu.

Zvířata, která jsou z důvodu paratuberkulózy vyřazena, musí být nahrazena buď zvířaty z vlastního odchovu, nebo nákupem obvykle březích jalovic; ztráty vyvolané vyřazením nemocné krávy lze tedy ocenit pomocí nákupní ceny za vysokobřezí jalovici.

Rozdíl mezi jatečnou cenou z chovu vyřazené krávy a nákladem na odchov, popř. nákup vysokobřezí jalovice zatěžuje ekonomiku výroby mléka odpisy zvířat (ztráta z brakování) (Kvapilík, 2006).

Např. Kreeger (1991) předpokládal cenu za náhradní jalovici dosahující přibližně 1100 USD.

Po vyřazení zvířete nastává perioda, v níž „náhradní“ zvíře ještě není připraveno k produkci (Benedictus a kol., 1987).

Tedy na jedné straně se prohlubují ztráty, neboť náklady na provoz celého chovu stále trvají, na druhé straně se snižují příjmy v důsledku nižší celkové produkce tržního mléka, a to vlivem zařazení nelaktujících zvířat.

2.2.2.5. Náklady na realizaci ozdravovacích programů

Ozdravování stád skotu od paratuberkulózy je časově náročný, frustrující proces, který představuje pro vlastníky stád značnou finanční zátěž.

Vzhledem k dlouhé inkubační době, je toto onemocnění u skotu dlouhodobě subklinické, což může vést k maskování ztrát vznikajících v důsledku této nemoci. Finančně náročné kontrolní

programy je následně těžké ospravedlnit a u řady chovatelů se lze setkat s neochotou spolupracovat na těchto programech (Kennedy a Benedictus, 2001).

O tom, zda bude využívaný kontrolní program ekonomicky výhodný, rozhoduje mnoho faktorů – prevalence infekce v chovu, náklady na diagnostiku, přesnost používaných diagnostických testů, vhodné zásahy na základě výsledků testů (vyřazování infikovaných zvířat a různá chovatelská opatření), hygienická úroveň na farmě (především v odchovu telat) a též situace v agrárním sektoru (cena mléka, cena za náhradní zvíře; Dorshorst a kol., 2006).

Náklady na realizování kontrolních programů jsou složené z nákladů na veterinární služby, nákladů na diagnostiku a nákladů na změny v managementu chovu (Kennedy a Benedictus, 2001).

Náklady na diagnostiku

představují podstatnou část celkových nákladů (Collins a Sockett, 1993).

Collins a Sockett (1993) provedli srovnání šesti diagnostických metod a zjistili, že se náklady pohybují v rozmezí od 2,36 USD u ELISA testu až po 24,65 USD u DNA sondy.

Za optimální diagnostický test lze označit takový test, který má nejnižší cenu a nejvyšší senzitivitu a specifitu. Vysoká senzitivita a specifita minimalizuje počet falešně-positivních a falešně-negativních výsledků a následně i počet chybně vyřazených zvířat (Collins a Sockett, 1993). Je to majitel, který musí nést ekonomické důsledky plynoucí z falešně pozitivních a falešně negativních výsledků diagnostických testů.

Náklady na chovatelská opatření

Nedílnou součástí nákladů na kontrolní programy jsou náklady spojené se změnami managementu chovu, zejména zlepšení jeho hygienické úrovně (Groenendaal a Galligan, 1999; Kennedy a Benedictus, 2001). Cílem těchto zásahů je snížení infekčního tlaku prostředí, především důležité pro mladé věkové kategorie a následně snížení prevalence paratuberkulózy v chovu.

Konkrétní chovatelská opatření jsou uvedena v příslušné kapitole (2.1.2.). Pro příklad lze uvést využití mléčné náhražky, jakožto ekonomicky velmi výhodného nástroje prevence a kontroly paratuberkulózy u telat.

Stanovení těchto nákladů je velmi obtížné, vzhledem k tomu, že k nim dochází průběžně, nejedná se obvykle o nárazové změny a značné odlišnosti v nich jsou pochopitelně i mezi jednotlivými chovy (Hutchinson, 1996; Groenendaal a Galligan, 1999).

Prospěšnost zkvalitnění péče zejména o nejmladší věkové kategorie se neomezuje pouze na původce paratuberkulózy, ale představuje prevenci proti řadě jiných infekčních agens jako jsou *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, kryptosporidie a kokcidie (Hutchinson, 1996; Groenendaal a Galligan, 1999).

Zlepšení chovatelských podmínek chovu představuje nezbytnou součást všech kontrolních strategií. Bez jejich zavedení a dodržování, bude infekce v chovu setrvávat a může i nadále působit ekonomické ztráty (Lombard a kol., 2005).

2.2.2.6. Exportní a importní omezení

Na stáda s pozitivními *MAP* reagenty (v ELISA testu) jsou uvalována příslušná omezení týkající se přemísťování a obchodování do té doby, než se tato předběžná diagnóza potvrdí nebo bude naopak vyvrácena (Paisley, 2001). V případě nepovoleného přemísťování z těchto stád jsou chovatelé sankcionováni. Povolený je obvykle pouze prodej zvířat na porážku (Kennedy a Benedictus, 2001).

Mezi méně evidentní a zřídka uváděné ekonomické dopady paratuberkulózy patří ztráta genetického potenciálu chovných zvířat z důvodu předčasného vyřazování a z důvodu obchodních omezení. Možnost prodeje zvířat s vysokou chovatelskou hodnotou je, jak již bylo zmíněno, u infikovaných stád omezená (Kennedy a Benedictus, 2001).

Obchodní omezení vedou ke ztrátám na národní i mezinárodní úrovni. Státy jsou poškozovány vysokými náklady na realizované kontrolní programy, ztrátami z příjmu a obchodními omezeními mezi určitými státy (Whipple, 1991).

Karantény a obchodní omezení mohou mít dokonce větší ekonomický vliv než aktuální ztráty způsobené vlastní nemocí. Vyčíslení těchto důsledků je ovšem velmi obtížné (Jones, 1989).

2.2.2.7. Ztráty vznikající na úrovni jednotlivých farem a na úrovni státu

Řada studií, které se zabývaly ekonomickými ztrátami vyvolanými subklinickou a klinickou paratuberkulózou, došla k závěru, že toto onemocnění má výrazný vliv na ekonomiku a hospodaření jednotlivých postižených farem s následným ovlivněním celého mléčného průmyslu v dané zemi (Wilson a kol., 1995; Chi a kol., 2002; Ott a kol., 1999). Hodnocení bylo prováděno v různých státech a jednotlivé studie se více či méně lišily v položkách (ztrátách) zahrnovaných do výsledné celkové finanční ztráty.

Ztráty mléčného průmyslu ve státě Wisconsin (USA), které vznikly v důsledku paratuberkulózy byly odhadnuty na 100 mil USD ročně (Sockett, 1996). Snížená mléčná produkce u samotné subklinické paratuberkulózy stojí stát Wisconsin 1,85 mil USD ročně (Nordlund a kol., 1996). Ztráty v Pennsylvánii (USA) byly oceněny na více než 5,8 mil USD ročně (počítány ztráty na mléčné produkci a dále ztráty v důsledku snížené jatečné hodnoty). Meyer a Hall (1994) s pomocí dvou různých postupů, zjistili přibližně shodnou roční ztrátu 4,5 mil USD pro mléčný průmysl v Kentucky (USA). Tato suma zahrnovala: ztráty v důsledku předčasného vyřazování infikovaných dojnic (3,5 mil USD ročně) a ztráty způsobené úhyny dojnic (1,0 mil USD ročně). Pro porovnání lze uvést, že ztráty u masného skotu činily pouze 1,5 mil USD.

Největší ekonomický vliv má ovšem paratuberkulóza na úrovni jednotlivých farem a stád (Whipple, 1991). Vliv infekce se liší mezi jednotlivými farmami v závislosti na chovatelských opatřeních užívaných k eliminaci onemocnění.

2.2.2.8. Sociální aspekt paratuberkulózy

Jak již bylo uvedeno na začátku této kapitoly, ztráty, které chovatelům vznikají, nemají pouze hmotnou podstatu.

Pro chovatele-vlastníka infikovaného stáda je velmi složité a stresující čelit celé situaci. Některé státy tuto skutečnost dokonce zohledňují v kontrolních programech, např. v australském ozdravovacím programu je jeden z úkolů označen jako „*Minimalizace sociálních, ekonomických a obchodních vlivů.*“ Zahrnuje v sobě mimo jiné i takový dílčí cíl, jakým je poskytování podpory postiženým producentům a dokonce dílčí cíl spočívající v „*odstranění stigmatu spojeného s paratuberkulózou a snižování emocionálního stresu*“ (Kennedy, 2007).

2.3. Diseminace původce paratuberkulózy ve tkáních a jeho vylučování do mléka

U všech mykobakteriálních infekcí je imunita závislá na buňkami zprostředkované imunitní odpovědi, zatímco protilátková imunitní odpověď má malý nebo dokonce žádný protektivní význam (Chiodini, 1996). Přítomnost protilátek je u paratuberkulózy neblahým příznakem a naznačuje zvýšení bakteriálního tlaku na organismus zvířete, neboť současně dochází k útlumu buněčné odpovědi. Výsledkem může být systémová infekce (Chiodini, 1996) s následnou diseminací *MAP* do různých orgánů, ačkoliv je paratuberkulóza všeobecně považována za střevní infekci (Sweeney a kol., 1992a).

Primárním místem postižení organismu je střevní trakt, nejčastěji pak koncový úsek jejunu a ileum (Rideout a kol., 2003; Amemori a kol., 2004; Antognoli a kol., 2008), včetně korespondujících mezenterálních mízních uzlin. U některých infikovaných zvířat byla prokázána diseminace *MAP* do různých extraintestinálních tkání. Předpokládá se, že šíření *MAP* do těchto tkání se uskutečňuje hematogenní nebo lymfatickou cestou (Whittington a Windsor, 2009).

U krav bylo *MAP* izolováno z tkáně dělohy (Sweeney, 1996), mízních uzlin vemene a parenchymu mléčné žlázy (Sweeney, 1996; Brady a kol., 2008). Identifikace *MAP* v mléce byla spojena s rozvojem infekce (Slana a kol., 2008). Přítomnost *MAP* byla potvrzena v různých částech reprodukčního traktu býků a ve spermatu (Sweeney, 1996; Ayele a kol., 2004; Buergelt a kol., 2004). Dále bylo *MAP* prokázáno v mandlích, plicích, srdeční svalovině, játrech, slezině a ledvinách (Pavlik a kol., 2000a; Sweeney a kol., 2006; Antognoli a kol., 2008). Ve svalovině není izolace *MAP* dosud zcela striktně potvrzena – zatímco Meadus a kol. (2008) identifikovali *MAP* ve svalovině pomocí molekulárních metod, Antognoli a kol. (2008) nebyli s využitím kultivačních technik v izolaci *MAP* úspěšní.

K přenosu *MAP* dochází také *in utero*, což bylo v několika případech ověřeno izolací původce z plodů pocházejících od silně infikovaných matek (Seitz a kol., 1989; Sweeney, 1996).

Kruip a kol. (2003) se ve své studii snažili zjistit souvislost mezi subklinickou infekcí a rizikem infikování pohlavního systému s důrazem na oocyty a embrya. Od 16 dojníc slabě vylučujících *MAP* výkaly získali děložní výplach, bioptáty děložní sliznice, oocyty a embrya. Všechny vzorky byly po 12 měsících kultivace negativní, což autoři vysvětlují subklinickou formou paratuberkulózy a slabým vylučováním *MAP* výkaly.

Diseminace do extraintestinálních tkání u subklinických případů paratuberkulózy není tak dobře zdokumentována jako u případů klinických (Antognoli a kol., 2008).

Pravděpodobnost diseminace *MAP* se zřejmě zvyšuje s intenzitou infekce (Sweeney, 1996) a u většiny klinických případů paratuberkulózy se diseminace *MAP* předpokládá. V terminálním stádiu infekce se buňky imunitního systému stávají funkčně neodpovídavé na mykobakteriální antigen, což má za následek nekontrolované množení a šíření *MAP* v organismu (Chiodini, 1996; Rideout a kol., 2003).

3. Cíle

Cíle práce jsou shrnuty v následujících bodech:

1. Vyhodnotit distribuci infekce v jednotlivých věkových kategoriích stáda dojeného skotu a posoudit diseminaci *MAP* v různých orgánech, včetně jeho vylučování výkaly a mlékem.

Motivace: Distribuce *MAP* napříč všemi věkovými kategoriemi infikovaného stáda dojeného skotu zatím v žádné práci popsána nebyla, přitom její vyhodnocení by mohlo přinést údaje z epizootologického pohledu velmi významné.

Studií, které se zabývají diseminací *MAP* do extraintestinálních tkání u subklinických případů paratuberkulózy je, v porovnání s klinickými případy, velmi málo (Antognoli a kol., 2008).

Informace o tom, které orgány a s jakou intenzitou mohou být kolonizovány *MAP*, jsou důležité nejen z hlediska prohloubení znalostí o patogenezi infekce, ale také z hlediska prevence možné kontaminace výrobků z živočišných surovin a tím ochrany spotřebitele.

2. Posoudit význam paratuberkulózy u dojeného skotu.

Motivace: Zhodnocení nákladů, event. ztrát ve spojitosti s jednotlivými chorobami představuje hodnotnou ekonomickou informaci, jež poskytuje data pro rozhodování o použití kontrolních programů a o jejich užitku (Johnson-Ifearulundu, 2000; Bennett, 2003).

V České republice nebyl dosud, vzhledem k předchozímu relativně nízkému výskytu, význam paratuberkulózy hodnocen.

Studie, zabývající se vztahem mezi pozitivním *MAP* statusem a mléčnou produkcí, mléčnými komponenty a reprodukční výkonností, je nezbytné stále doplňovat o další poznatky (Tiwari a kol., 2007).

3. Zhodnotit ozdravování chovů od paratuberkulózy v České republice.

Motivace: Vývoj prevalence infekce v ozdravovaném chovu, preventivní chovatelská opatření a dílčí cíle, které ozdravování přináší, poskytují cenné informace o úspěšnosti procesu ozdravování a mohou tvořit podklad při rozhodování o dalších postupech v chovech skotu stížených paratuberkulózou.

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Modelové chovy – historie a obecná charakteristika

Pro studium významu paratuberkulózy byly vybrány dva chovy dojeného skotu – chov S a chov C. V chovu S byl chován skot plemene Jersey a v chovu C skot plemene Holštýn. Zatímco chov S lze považovat za rodinnou farmu a patřil spíše do kategorie polointenzivních chovů, chov C je společnost s ručením omezeným, s intenzivním chovem skotu.

Chov S

Založení chovu skotu plemene Jersey

Stádo skotu plemene Jersey bylo zakoupeno v září roku 1994. Celkem 50 jalovic v 5. až 7. měsíci březosti pocházelo z 23 různých oblastí Dánska od 29 chovatelů (**Tabulka 1**). Pořizovací cena jedné jalovice činila 37 000,- Kč, při celkové kupní ceně 1 850 000,- Kč. Na nákup stáda nebyly čerpány žádné dotace, ale byly poskytnuty finanční prostředky v podobě úvěru z Podpůrně garančního fondu.

Charakteristika farmy

Farma S se nachází v řepařské výrobní oblasti, v nadmořské výšce 400 m.n.m., na zemědělské půdě o rozloze 90 ha: 32 ha tvoří pastviny a 58 ha představuje orná půda. Rostlinná výroba této farmy byla orientována pouze na produkci vlastních krmiv (kukuřice, vojtěško-tráva a další); živočišná výroba na chov dojeného skotu plemene Jersey.

Historie farmy

Pozemky, na kterých se farma rozkládá, byly získány restitucí po roce 1989. Stavba prvního stájového objektu byla započata v roce 1993, stavba druhého stájového objektu byla zahájena až v roce 1997. Od roku 1994 je farma využívána k zemědělské činnosti.

Tabulka 1: Přehled o původu importovaných zvířat

Chovatel		
Poř. č.	Jméno	Oblast
1	Niels Nielsen	Faaborg
2	Karl Hansen	Faaborg
3	Børge Hansen	Faaborg
4	Bent Andersen*	Tranekaer Aarup
5	Henning Nørskov	Silkeborg
6	Laurits Christensen	Kjellerup
7	Morten Pedersen	Kjellerup
8	Jørgen Holm	Svendborg
9	Herman Nielsen	Ulstrup
10	Poul G. Hansen	Harndrup
11	Henning E. Jensen	Varde
12	Jørgen Henriksen	Varde
13	Grethe Jensen	Varde
14	Hans Gerner	Aabenraa
15	Lorenz Jochimsen	Aabenraa
16	Jens Jochimsen	Marslet
17	Knud Petersen	Marslet
18	Svend Larsen	Millinge
19	Egon Madsen	Ørbaek
20	Erik Beske	Sakskøbing
21	Hans Hansen	Slagelse
22	Hans Christian Dahl	Krusa
23	Kurt Larsen	Lemming
24	Preben Pihl Jensen	Humble
25	Karl Rasmussen	Idestrup
26	Peder Hansen	Glamsbjerg
27	H&O Skov Andersen	Korsør
28	Jørgen Steen	Holbaek
29	Ingvard Bak	Ersleu

* vlastník dvou chovů

Farma C

Založení chovu skotu plemene Holštýn

Tento chov je pokračováním státního podniku po jeho privatizaci. Většina stáda tohoto chovu byla pořízena nákupem z Holandska (v roce 1994) a z Francie (v roce 1995), pouze malá část stáda byla původní.

Charakteristika chovu

Jedná se o intenzivní chov dojeného skotu plemene Holštýn. Podnik se nachází v bramborářské výrobní oblasti, 450 m.n.m. Orná půda tvoří 420 ha, louky 180 ha. Podnikání je zaměřeno jak na rostlinnou (obilniny, kukuřice), tak na živočišnou výrobu (mléko, maso).

4.2. Metody ozdravování sledovaných chovů

Při řešení paratuberkulózy v ČR se postupuje podle zákona č. 166/1999 Sb., o veterinární péči, ve znění zákona č. 332/2008 Sb. (veterinární zákon); vyhlášky č. 288/2008 Sb., o opatřeních pro předcházení a zdolávání nálezů a nemocí přenosných ze zvířat na člověka. Konkrétní postupy popisuje příslušný metodický návod vydaný Státní veterinární správou České republiky. Donedávna platil Metodický návod SVS ČR č. 6/2001 „Paratuberkulóza“. Od března 2008 vstoupil v platnost Metodický návod SVS ČR č. 5/2008.

Předkládaná práce byla realizována v letech 2004 až 2007, proto se postup ozdravování řídil původním metodickým návodem.

Metodický návod č. 6/2001 obsahuje doporučení k prevenci paratuberkulózy v chovech a k řešení při výskytu paratuberkulózy v chovu. Každý ozdravovací postup má vznikat na teoretických základech s důrazem na konkrétní podmínky v jednotlivých chovech, jakými jsou: velikost stáda, prevalence infekce, možnosti obnovy stáda, finanční možnosti chovatele aj. Krajská veterinární správa příslušného kraje musí po zvážení všech okolností zvolit racionální řešení pro daný chov, tedy buď radikální, nebo eliminační metodu ozdravování.

Chov S

V tomto chovu byla zvolena radikální metoda ozdravení spočívající ve vyřazení všech zvířat ze stáda. Lze ji doporučit v případě, že se ve stádě vyskytuje nákaza klinicky, a že bakteriologické vyšetření potvrdí více než 10 % pozitivních zvířat.

Chov C

V chovu C byla zvolena metoda eliminační, která je založena na vyřazení nemocných a všech pro stádo rizikových zvířat. Při této metodě se z chovu vyřazují:

1. klinicky podezřelá zvířata, vyhledávaná průběžně pomocí anamnestických údajů zainteresovaných osob (zejm. ošetřovatelů, soukromých veterinárních lékařů, zootechnika aj.);
2. všechna laboratorně pozitivní zvířata s nálezem původce paratuberkulózy ze vzorků výkalů;
3. potomci matek s laboratorně prokázaným původcem paratuberkulózy ve výkalech nebo orgánech, narození v posledních 12 měsících (podle stupně postižení orgánů střevního traktu matky a vyřazeného potomka) příp. i v delším období.

Při eliminační metodě se laboratorně došetřují orgány střevního traktu všech klinicky nemocných zvířat a bakteriologicky se vyšetřují vzorky výkalů všech zvířat starších 18 měsíců v intervalu 5 až 7 měsíců.

Při zjištění negativního výsledku u všech vyšetřovaných zvířat, nastupuje různě dlouhá pozorovací doba (stanoveno příslušným inspektorátem SVS ČR).

Nákaza může být prohlášena za zdolanou, pokud:

- a) při použití radikální metody byla všechna vnímavá zvířata z ohniska odstraněna.
- b) při použití eliminační metody byl výsledek dvou po sobě jdoucích laboratorních vyšetření výkalů negativní.
- c) byla provedena závěrečná dezinfekce, dezinfekce a deratizace.

4.3. Odběr vzorků orgánů, výkalů, mléka a vnějšího prostředí

Vzorky orgánů:

Při radikální likvidaci 131 zvířat chovu S byly na jatkách odebírány vzorky orgánů:

Gastrointestinální trakt:

- jejunum sliznice začátek (jejunum I M)
- jejunum mízní uzlina začátek (jejunum I LN)
- jejunum sliznice konec (jejunum II M)
- jejunum mízní uzlina konec (jejunum II LN)
- ileocaecální chlopeň sliznice
- ileocaecální chlopeň mízní uzlina.

Jiné mízní uzliny:

podčelistní

plicní

jaterní

vemene.

Parenchymatózní orgány:

slezina

játra.

Pohlavní orgány:

děloha

plod (střevo a játra)

vemeno

varlata plemenného býka.

Vzorky orgánů byly odebírány do sterilních vzorkovnic, řádně označeny a až do kultivačního vyšetření uchovány v mrazícím boxu (-20°C).

Přehled o počtech jednotlivých vzorků orgánů podle věkových kategorií je znázorněn v **Tabulce 5** (kapitola Výsledky).

Vzorky výkalů:

U zvířat chovu S byly výkaly odebrány na jatkách během radikální likvidace stáda.

V chovu C bylo od počátku roku 2004 uskutečněno 14 plošných kultivačních vyšetření. Celkem bylo kultivačně vyšetřeno 2899 vzorků výkalů. Plošná kultivační vyšetření byla do konce roku 2006 uskutečňována s frekvencí čtyř vyšetření ročně, v následujícím roce byla frekvence snížena na dvě vyšetření ročně. Se změnou metodického návodu v roce 2008 bylo kultivační vyšetřování zvířat na paratuberkulózu ze strany chovatele zcela ukončeno.

Vzorky výkalů byly odebírány individuálně z konečníku (u zvířat chovu S po poražení zvířete) pomocí gumové jednorázové rukavice, byly uloženy do vzorkovnic, řádně označeny a uchovány až do kultivačního vyšetření v mrazícím boxu (-20°C).

Vzorky mléka:

V chovu S byl v průběhu likvidace stáda uskutečněn odběr vzorků mléka jednorázově na jatkách. Od 58 dojnic byly odebrány individuální čtvrt'ové vzorky mléka (232 vzorků). U 11 dojnic byly odebrány směsné vzorky mléka ze všech čtvrtí vemene.

Chov C:

V prvním období (konec roku 2004) byl uskutečněn odběr individuálních čtvrt'ových vzorků mléka od šesti dojnic, které měly pozitivní výsledek kultivačního vyšetření výkalů (tj. vylučovatelky *MAP* výkaly) a bazénové vzorky. Odběr byl realizován v průběhu tří dnů při ranním a večerním dojení, celkem bylo odebráno 150 vzorků mléka.

V období 2006 - 2007 byly uskutečněny čtyři odběry vzorků mléka (ranní a večerní dojení) od 16 vylučovatelek *MAP* výkaly, současně byly odebrány bazénové vzorky a mléčné filtry. Mléko bylo odebíráno do sterilních vzorkovnic, řádně označeno a ve většině případů uloženo v mrazícím boxu. Vzorky mléka, které bylo možné vyšetřit do druhého dne po odběru, byly uchovány v chladničce při teplotě +4°C.

Vzorky vnějšího prostředí:

V chovu S byly realizovány dva odběry – jeden před a druhý po radikální likvidaci stáda a po provedené závěrečné asanaci objektu stájí a pastvin za účelem ověření účinnosti dezinfekce. V chovu C bylo uskutečněno šest odběrů při celkovém počtu 150 vzorků. Volba vzorků byla poplatná předpokládanému šíření *MAP* v prostředí, tedy se zaměřením především na místa vyšší frekvence pohybu zvířat a na porodní boxy, kde byla odebírána podestýlka, seškraby stěn a hrazení, voda a sediment z napáječek.

Pevné vzorky byly odebírány pomocí dřevěných špachtlí do igelitových sáčků s rychlouzávěrem; tekuté vzorky byly nabírány do NTS lahví. Až do vlastního vyšetření byly vzorky uchovány v chladničce při teplotě + 4°C.

4.4. Použité metody diagnostiky paratuberkulózy

4.4.1. Kultivační vyšetření

Orgány

Vzorky orgánů o hmotnosti přibližně 1 g byly homogenizovány ve stomacheru (Kleinfeld Labortechnik GmbH, Gehrden, Germany) a poté dekontaminovány v 0,75% HPC (Hexadecyl Pyridinium Chloride: N-cetylpyridinium chloride monohydrate, No. 102340 Merck) 24 hodin.

Vzorky byly centrifugovány 20 minut při rychlosti 2000 až 3000 rpm.

Dvěstě μl sedimentu (2×100) z každého takto dekontaminovaného vzorku bylo nakultivováno na 3 lahvičky s Herroldovým vaječným médiem (přídavek mykobaktinu) a inkubováno při 37°C po dobu 3 měsíců.

Výkaly, vnější prostředí

Přibližně 1 g vzorku byl přenesen do 50 ml lahvičky obsahující 30 ml sterilní destilované vody. Důkladné rozmělnění vzorku ve vodě bylo zajištěno třepáním na třepačce po dobu 30 min. Poté byly lahvičky ponechány 30 min při laboratorní teplotě, aby došlo k usazení větších částic. 5 ml sedimentu bylo přeneseno do 50 ml lahvičky s 25 ml 0,9% HPC a dekontaminováno po dobu 72 hod.

Dvěstě μl sedimentu z každého vzorku bylo nakultivováno na 3 lahvičky s Herroldovým vaječným médiem a inkubováno při 37°C po dobu 3 měsíců.

Mléko

Vzorky mléka byly centrifugovány 15 min při rychlosti 2 500 rpm. Po slítí supernatantu bylo k sedimentu přidáno 5 ml 0,75% HPC. Vzorky byly 4 hodiny třepány při laboratorní teplotě a poté opět centrifugovány 15 min při rychlosti 2 500 rpm. S výjimkou přibližně 1 ml byl supernatant odstraněn a spolu se sedimentem kultivován v množství 200 μl (2×100 ; viz. výše).

Z mléčného filtru (pás 1m \times 5 cm) byly ze třech míst odstřiženy vzorky o velikosti 5 \times 5 cm. Každý jednotlivý vzorek byl vložen do sáčku s rychlouzávěrem, bylo přidáno 30 ml sterilní destilované vody a takto připravené vzorky byly homogenizovány ve stomacheru. Z celého

množství se 7 ml odlije do zkumavky a odstředí (15 min při 2 500 rpm), přidá se 5 ml 0,75% HPC a nechá se 4 hodiny třepat při laboratorní teplotě. Poté se opět odstředí (15 min. při 2 500 rpm), supernatant se slije a sediment je kultivován v množství 200 µl (2 × 100; viz. výše).

Odečítání a hodnocení:

Za 14 dní po kultivaci byla provedena první kontrola za účelem vyřazení případných kontaminací.

Další odečítání se uskutečnilo za 4, 8 a 12 týdnů po kultivaci.

CFU bylo stanoveno jako průměr CFU ze tří lahviček (Herroldovo médium) použitých ke kultivaci jednoho vzorku (= 1 g). Intenzita infekce byla vyjádřena:

- + slabá infekce – do 10 CFU
- ++ středně silná infekce – do 30 CFU
- +++ silná infekce – nad 31 CFU

Přítomnost AST v narostlých koloniích byla potvrzena obarvením dle Z-N. Další identifikace byla zajištěna laboratoří molekulární biologie.

Subkultivace izolátů

Pro subkultivaci primokultur byly použity dva typy Herroldova vaječného média - s mykobaktinem a bez mykobaktinu – pro určení růstové dependence *MAP* na mykobaktin.

Kultivační médium

Půda dle herolda (HEYM)

Složení 1 l půdy:

9,0 g	Bacto-pepton (Oxoid, 0118-01-8)	4,0 g	Pyruvát sodný
4,5 g	NaCl	0,05 g	Amphotericin B
9,0 g	Agar No. 1 (Oxoid, 0142-01), Agar Noble (Difco), 15 g	0,05 g	Chloramphenicol
2,7 g	Beef Extract (Difco 0126-01-8) nebo LAB-LEMCO (Oxoid, code L29)	200 000	MJ Penicillin
25,0 ml	Glycerin	2,0 ml	Mykobaktin J (produkt laboratoře Vúvel Brno)
870,0 ml	Destilovaná voda	5,0 ml	2% malachitová zeleň
4,0 ml	1 N NaOH	6 ks	Homogenizované vaječné žloutky

4.4.2. Molekulární metody

Metody molekulární biologie byly zajištěny pracovníky laboratoře molekulární biologie Oddělení bezpečnosti potravin a krmiv Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně.

K molekulární identifikaci AST pozitivních izolátů byla využita metoda IS900 PCR – detekce specifického úseku DNA IS900 a u vzorků mléka byla využita také sekvence F57.

Izoláty *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* byly diferencovány pomocí metody IS900 RFLP využívající restriční endonukleázu BstEII a PstI (Pavlík a kol., 1999a,b).

4.5. Věkové kategorie zvířat v chovu S

Zvířata chovu S vyřazená při radikální likvidaci, byla pro následné zpracování přehledně rozdělena dle věku do jednotlivých kategorií s označením A, B, C, D:

Kategorie A (44 zvířat) - zvířata do věku 1,5 roku (v této kategorii je zahrnuto 32 telat), nejmladší věková kategorie, nepodléhá plošným kultivačním vyšetřením výkalů;

Kategorie B (30 zvířat) - zvířata ve věku 1,6 až 3 roky, zvířata nastupující do produkce;

Kategorie C (45 zvířat) - zvířata ve věku 3,1 až 8 let, období vrcholu produkce;

Kategorie D (12 zvířat) – zvířata nad 8,1 let, v této kategorii je zahrnuto pět zvířat z původního importu z Dánska (z toho tři starší 12 let)

4.6. Zhodnocení produkčních a reprodukčních ukazatelů

Pro zhodnocení produkčních ukazatelů a parametrů reprodukční výkonnosti byla použita data z kontroly užitkovosti*.

Zhodnocení produkčních a reprodukčních znaků

Sledované produkční znaky - kg mléka za 305 denní (normovanou) laktaci, kg bílkovin za 305 denní laktaci, obsah tuku (%), obsah bílkoviny (%), obsah laktózy (%).

Sledované reprodukční parametry – mezidobí (dny), inseminační interval (dny), servis perioda (dny), počet inseminací.

* Metoda A 4, tj. 12 – 13 kontrol za rok, (výstup: *Měsíční výsledky KU skotu*)

Pro zhodnocení byla použita dostupná data za jednotlivé laktace od pozitivních a kontrolních dojnic z obou chovů. Data byla rozdělena podle pořadí laktace: v chovu S do tří skupin – 1, 2, ≥ 3 ; v chovu C do dvou skupin – 1, 2. (**Tabulka 2**).

Pozitivní dojnice chovu S – dojnice vyřazené před radikální likvidací stáda na základě pozitivní kultivace výkalů a dojnice vyřazené při radikální likvidaci, kultivačně pozitivní ve tkáních.

Kontrolní dojnice chovu S – dojnice vyřazené při radikální likvidaci, kultivačně negativní.

Pozitivní dojnice chovu C – dojnice kultivačně pozitivní ve výkalech a následně vyřazené.

Kontrolní dojnice chovu C – dojnice kultivačně negativní ve výkalech.

Tabulka 2: Počty pozitivních (P) a kontrolních (N) dojnic pro zhodnocení jakostních znaků mléka, mléčné užitkovosti a reprodukčních ukazatelů

Chov	Pořadí laktace	Jakostní znaky		Užitkovost		Mezidobí		Inseminační interval		Servis perioda		Inseminační index	
		P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N
Chov S	1	37	20	21	9	-	-	39	20	39	20	39	20
	2	25	22	8	8	27	23	28	20	27	20	28	20
	≥ 3	21	31	14	14	25	41	24	38	24	38	24	38
Chov C	1	20	24	17	19	-	-	21	23	21	23	21	23
	2	23	22	14	12	23	21	21	20	21	20	21	20

Intervaly servis periody

Zjištěné hodnoty servis periody byly rozděleny do intervalů, které jsme zvolili podle Kvapilíka a kol. (2009) takto: interval do 40 dní, 41 až 75 dní, 76 až 90 dní, 91 až 120 dní, nad 121 dní.

Ekonomické zhodnocení servis periody

Výpočet ekonomické ztráty způsobené prodloužením servis periody byl navržen podle Kvapilíka (2006). Jako limitní jsme zvolili servis periodu o délce 90 dní. Každý den nad limitní hodnotu představuje ekonomickou ztrátu (tj. snížení tržeb a zvýšení nákladů) 50 až 70 Kč.

4.7. Statistická analýza

K statistické analýze, jejímž cílem bylo posoudit, zda se věková kategorie uplatňuje jako statisticky významný zdroj proměnlivosti prevalence *MAP*, byl použit program GraphPad Prism 5.02 (GraphPad Software, Inc., CA, USA). K ověření normality dat byl použit D'Agostino &

Pearson omnibus normality test. Celková statistická významnost vlivu věkové kategorie na prevalenci *MAP* byla testována neparametricky, pomocí Kruskal-Wallisova testu. Následně byla testována statistická významnost rozdílů mezi jednotlivými věkovými kategoriemi zvířat, a to pomocí Dunnetova testu.

K statistické analýze, jejímž cílem bylo potvrdit či vyvrátit nulovou hypotézu ve znění H_0 : podíl pozitivních dojnic s pořadím poslední laktace (PPL) = 1 není vyšší než podíl pozitivních dojnic s PPL > 1 byl použit Fischerův exaktní jednostranný test (program GraphPad Prism 5.02).

K statistické analýze, jejímž cílem bylo potvrdit či vyvrátit nulovou hypotézu H_0 : Intenzita infekce pozitivních dojnic s PPL = 1 se neliší od intenzity infekce pozitivních dojnic s PPL > 1 byl použit χ -kvadrát test (program GraphPad Prism 5.02).

K statistickému zhodnocení produkčních a reprodukčních ukazatelů v obou sledovaných chovech byl použit program GraphPad Prism 5.02 (GraphPad Software, Inc., CA, USA). Normalita dat byla ověřována pomocí D'Agostino & Pearson omnibus normality testu, statistická významnost rozdílů byla testována pomocí nepárového t-testu, u něhož byla v případě různých rozptylů použita Welchova korekce.

5. VÝSLEDKY

5.1. Tlumení nákazy v chovu S

5.1.1. Průběh nákazy v chovu S

Při nákupu zvířat v roce 1994 byla v rámci karantény dvakrát prováděna sérologická depistáž metodou reakce vazby komplementu (RVK) na přítomnost protilátek proti antigenu připravenému z původce paratuberkulózy s negativním výsledkem. V dalších dvou letech byla zvířata sérologicky vyšetřována metodou RVK jedenkrát ročně, taktéž s negativním výsledkem.

5.1.2. Vzplanutí a suspektní diagnostika

Klinicky bylo, podle sdělení obvodního veterinárního lékaře, v únoru 1998 diagnostikováno průjmové onemocnění u jedné krávy. Průjem byl spojován s pastevním chovem. Po neúspěšné symptomatické terapii (dieta a antibiotika) byla dojnice nutně odporožena. Laboratorní vyšetření střevního traktu na paratuberkulózu nebylo provedeno. Další výskyt průjmového onemocnění byl zaznamenán v listopadu téhož roku. Bez předchozího kontaktu s nákazou, nebylo k laboratornímu vyšetření přistoupeno.

S přihlédnutím k následnému průběhu morbidity ve stádě lze vyslovit předpoklad o tom, že již tyto dojnice představovaly první klinické případy nákazy.

5.1.3. Laboratorní diagnostika paratuberkulózy

V roce 2002 byly u pěti dalších dojnic zaznamenány klinické příznaky typické pro paratuberkulózu. Dojnice byly k diagnostickým cílům nutně odporoženy. Laboratorním vyšetřením byla paratuberkulóza potvrzena nejprve sérologicky metodou RVK, ELISA a imunodifúzním testem (IDT), poté kultivací orgánů s izolací původce paratuberkulózy, který byl identifikován metodou IS900 PCR.

V lednu 2004 byl ke spolupráci při tlumení paratuberkulózy v chovu S přizván Výzkumný ústav veterinárního lékařství v Brně.

Byla uskutečněna tři plošná kultivační vyšetření výkalů všech zvířat starších 18 měsíců (**Tabulka 3**). Při prvním plošném vyšetření byl původce nákazy zjištěn pouze u dvou zvířat. Druhé plošné vyšetření odhalilo již 19 zvířat vylučujících původce paratuberkulózy výkaly. Při

třetím plošném kultivačním vyšetření byla zjištěna dvě zvířata vylučující původce paratuberkulózy.

Tabulka 3: Výsledky plošných vyšetření výkalů s vyjádřením intenzity vylučování *MAP*

Vyšetření výkalů	Vyšetřená zvířata			Intenzita vylučování					
	n	Pozit.	%	Silná		Střední		Slabá	
				n	%	n	%	n	%
1.	115	2	1,7	2	100,0	0	0	0	0
2.	111	19	17,1	7	36,8	1	5,3	11	57,9
3.	98	2	2,0	1	50,0	0	0	1	50,0
Celkem		23		10		1		12	

Při došetřování orgánů poražených dojnic, které již většinou vykazovaly klinické příznaky charakteristické pro paratuberkulózu, byla prokázána rozsáhlá infekce střevního traktu provázená výraznými patologickými změnami ve střevním traktu (prosáknutí mizních uzlin, gyrifikace střevní sliznice).

Celkový počet laboratorně diagnostikovaných pozitivních zvířat do zahájení radikální likvidace stáda byl 29 ks (**Tabulka 4**).

Tabulka 4: Incidence paratuberkulózy v jednotlivých věkových kategoriích před radikální likvidací stáda

Věk (rok)	Počet zvířat	Infikovaná zvířata	
		n	%
< 1	NT	NT	NT
1	20	2	10,0
2	20	2	10,0
3	20	8	40,0
4	22	6	27,3
5	5	2	40,0
6	5	0	0
7	13	2	15,4
8	1	0	0
9	5	2	40,0
10	0	0	0
11	6	2	33,3
12	8	3	37,5
Celkem	125	29	23,2

NT – netestováno

5.1.4. Epizootologická analýza a posouzení rizik

Při vstupní depistáži bylo zjištěno, že dojnice a další kategorie skotu jsou chovány v jednom objektu s přílehlými pastvinami. Těsný kontakt všech věkových kategorií skotu (tedy i mladých jedinců do 6 měsíců) představoval značné riziko pro šíření původce paratuberkulózy.

Telata byla po narození ihned přesouvána do individuálních venkovních bud, zde byla chována do věku 2 měsíců. Poté byla skupinově ustájena na hluboké podestýlce ve stáji, ve které byl současně ustájen také plemenný býk a s ním obvykle jedna až tři jalovice nebo krávy, které opakovaně nezabřezávaly po umělé inseminaci.

Kotce pro telata byly od býka a jalovic/krav odděleny pouze trubkovým hrazením, které nezabraňovalo kontaktům zvířat a tedy ani možnosti přenosu původce paratuberkulózy.

Další rizikový epizootologický faktor spočíval ve výživě telat. Telata byla krmena směsným mlékem bez jakékoliv úpravy, což s ohledem na dosud publikované informace o vylučování původce paratuberkulózy mlékem, znamenalo další pravděpodobný zdroj nakažení telat.

Tento nedostatek byl na doporučení vyřešen tepelnou úpravou směsného mléka (80° C 30 min.) před napájením telat.

5.1.5. Tlumení paratuberkulózy

V chovu S bylo nejprve zahájeno, vzhledem k poměrně příznivým výsledkům prvního plošného kultivačního vyšetření, ozdravování eliminační metodou.

Později ovšem, na základě analýzy výsledků terénních depistáží, vysokého počtu vylučovatelek *MAP* výkaly i klinicky nemocných zvířat a na základě závěrů vztahujících se ke známým zákonitostem epizootologického procesu paratuberkulózy u skotu, bylo po konzultaci všech zainteresovaných subjektů a zvážení možností chovatele, rozhodnuto řešit tlumení nákazy v chovu S radikální metodou.

5.1.6. Postup radikální metody tlumení paratuberkulózy

V rámci mimořádných veterinárních opatření byl příslušnou Krajskou veterinární správou nařízen tento postup radikální likvidace chovu:

1. Poražení všech vnímavých zvířat v chovu.
2. Asanace stájových prostor. Stáje, pracovní pomůcky, sklady krmiva, steliva a volné plochy včetně přístupových cest v rámci hospodářství bylo nařízeno důkladně mechanicky očistit za

použití horké páry a následně dezinfikovat 6% chloraminem aktivovaným čpavkem. Dřevěné boudy pro telata bylo nařízeno zlikvidovat spálením.

3. Asanace a obnova pastevního areálu. Pastviny bylo nařízeno povápnit dolomitickým vápencem s přidavkem prachového nehašeného vápna v dávce 1,5 t/ha, rozrušit drn a následně, za nejdříve 2 týdny, zaorat. Před tímto ošetřením mělo být sejmuto elektrické oplocení pastvin, jehož dřevěné sloupky bylo stanoveno zlikvidovat spálením, ostatní součásti měly být důkladně mechanicky očištěny za použití horké páry a následně dezinfikovány 6% chloraminem aktivovaným čpavkem.

4. Likvidace krmiv, steliva a chlévské mrvy. Většinu krmiv bylo nařízeno zlikvidovat kompostováním. Stelivo mělo být likvidováno takto – u první vrstvy balíků slámy byla nařízena likvidace zkompostováním mimo hospodářství za předpokladu zajištění řádné fermentace a zaorání do orné půdy nejdříve po 3 měsících skladování, ostatní sláma odvezena z hospodářství před dezinfekcí volných ploch v hospodářství. Chlévskou mrvu bylo nařízeno odvést z hospodářství a zkompostovat se zajištěním řádné fermentace s následným zaoráním do orné půdy nejdříve po 3 měsících skladování.

5.1.7. Výsledky laboratorních vyšetření

Ze 131 poražených zvířat stáda skotu plemene Jersey bylo *MAP* izolováno od 49 (37,4 %) zvířat (**Tabulka 5**).

Celkem 11 (22,5 %) zvířat mělo pozitivní nález ve výkalech i v orgánech a 38 (77,6 %) zvířat mělo pozitivní nález pouze v orgánech. U žádného zvířete nebyla prokázána současná pozitivní kultivace výkalů a negativní kultivace orgánů.

Tabulka 5: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* ve čtyřech věkových kategoriích u 131 zvířat chovu plemene Jersey

Orgánový systém	Vzorek	Věková kategorie A (do 1,5 roku)			Věková kategorie B (1,6 – 3,0 roky)			Věková kategorie C (3,1 – 8,0 let)			Věková kategorie D (nad 8,0 let)			Celkem A - D		
		n	Poz.	%	n	Poz.	%	n	Poz.	%	n	Poz.	%	n	Poz.	%
Respirační systém	Podčelistní LN	44	0	0	30	1	3,3	45	1	2,2	12	0	0	131	2	1,5
	Tracheobronchiální LN	44	0	0	30	2	6,7	45	0	0	12	1	8,3	131	3	2,3
Trávicí systém	Slezina	44	0	0	30	1	3,3	45	0	0	12	0	0	131	1	0,8
	Jaterní tkáň	44	0	0	30	2	6,7	45	1	2,2	12	0	0	131	3	2,3
	Jaterní LN	44	0	0	30	4	13,3	45	0	0	12	0	0	131	4	3,1
	Jejunum I M	44	2	4,6	30	6	20,0	45	5	11,1	12	0	0	131	13	9,9
	Jejunum I LN	44	2	4,6	30	10	33,3	45	9	20,0	12	1	8,3	131	22	16,8
	Jejunum II M	44	0	0	30	8	26,7	45	6	13,3	12	0	0	131	14	10,7
	Jejunum II LN	44	2	4,6	30	14	46,7	45	14	31,1	12	0	0	131	30	22,9
	Ileocaekální chlopeň M	44	2	4,6	30	11	36,7	45	10	22,2	12	1	8,3	131	24	18,3
	Ileocaekální LN	44	2	4,6	30	13	43,3	45	7	15,6	12	0	0	131	22	16,8
Výkaly	44	1	2,3	30	4	13,3	45	6	13,3	12	0	0	131	11	8,4	
Pohlavní systém	Děloha	4	0	0	25	1	4,0	44	1	2,3	12	0	0	85	2	2,4
	Plod (střevo)	1	0	0	11	1	9,1	19	0	0	5	0	0	36	1	2,8
	Plod (játra)	1	0	0	11	1	9,1	19	1	5,3	5	0	0	36	2	5,6
Vemeno	Tkáň mléčné žlázy	4	0	0	27	0	0	44	1	2,3	12	0	0	89	1	1,1
	LN	4	0	0	27	1	3,7	44	0	0	12	0	0	89	1	1,1
	Mléko	2	0	0	18	0	0	39	0	0	12	0	0	69	0	0
Celkem		544	11	2,0	479	80	16,7	749	62	8,3	202	3	1,5	1974	156	7,9

LN = mízní uzlina, M = sliznice, I = kraniální úsek střeva, II = kaudální úsek střeva, Poz. – počet pozitivních zvířat

5.1.7.1. Výsledky kultivace vzorků výkalů

Z celkového počtu 49 zvířat infikovaných *MAP* bylo u 11 (22,5 %) prokázáno vylučování *MAP* výkaly (**Tabulka 5**). Slabé vylučování *MAP* bylo zjištěno u osmi zvířat (72,7 %): jedno zvíře bylo z věkové kategorie A (do 1,5 roku), tři zvířata z kategorie B (1,6 – 3,0 roky) a čtyři z kategorie C (3,1 - 8,0 let). Středně silné vylučování výkaly bylo potvrzeno u dvou zvířat (18,2 %): jedno z kategorie B a druhé z kategorie C. Silné vylučování *MAP* bylo zjištěno pouze u jednoho zvířete (9,1 %) z kategorie C. V kategorii D (nad 8,0 let) nebylo prokázáno vylučování *MAP* výkaly (**Tabulka 5, 6a, b**).

Tabulka 6a: Diseminace *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* u infikovaných zvířat do 3 let věku (věkové kategorie A a B)

Kat. /No.	LN		Slezina Tkáň	Játra		Jejunum I		Jejunum II		Ileocaecum		Děloha Tkáň	Plod			Vemeno			V	
	Podč.	Plic		Tkáň	LN	M	LN	M	LN	M	LN		Játra	M	Tkáň	LN	Mléko			
A/1	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-		
A/2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	+		
A/3	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-		
A/4	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+++	-	-	-	-	-	-	-		
A/5	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	NT	NT	-	-	-	-		
A/6	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	+	-	NT	NT	-	-	-	-		
A/7	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	NT	NT	-	-	-	-		
B/1	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	-	
B/2	-	-	-	-	-	-	++	-	++	++	-	-	NT	NT	-	-	-	-	-	
B/3	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++	-	NT	NT	-	-	-	-	-	
B/4	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	NT	NT	-	-	-	-	-	
B/5	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	-
B/6	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	+	-	.*	.*	-	-	-	-	-	-
B/7	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+++	-	NT	NT	-	-	-	-	-	-
B/8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	NT	-
B/9	+++	-	-	-	+	-	-	+++	+++	-	+++	-	NT	NT	-	-	-	-	NT	-
B/10	-	+	-	+	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	-	+	-	-	+	+
B/11	-	-	-	-	-	+++	+	++	+++	-	-	-	NT	NT	-	-	-	-	-	-
B/12	-	-	-	-	-	+	+	-	+++	+++	-	-	NT	NT	-	-	-	-	-	+
B/13	-	++	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B/14	-	-	-	-	-	+++	-	-	++	-	+++	-	NT	NT	-	-	-	-	-	+
B/15	-	-	-	-	-	-	+	-	+	++	+	-	NT	NT	-	-	-	-	-	-
B/16	-	-	-	-	+	+++	-	+	+++	+++	+++	-	NT	NT	-	-	-	-	-	-
B/17	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	NT	NT	-	-	-	-	-	-
B/18	-	-	+	+	+	-	++	+++	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	++
B/19	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	NT	NT	-	-	-	-	NT	-
B/20	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	NT	NT	-	-	-	-	NT	-
B/21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	-	NT	NT	-	-	-	-	NT	-

No. = číslo zvířete, **podč.** = podčelistní mizní uzlina, **LN** = mizní uzlina, **M** = sliznice, **I** = kraniální úsek střeva, **II** = kaudální úsek střeva, **V** = výkaly, **A** = věková kategorie A (do 1,5 roku), **B** = věková kategorie B (1,6 – 3,0 roky), + = slabá infekce (do 10 CFU), ++ = středně silná infekce (11- 30 CFU), +++ = silná infekce (více než 30 CFU), *vyšetřeny dva plody-dvojčata, NT = nevyšetřeno

Tabulka 6b: Diseminace *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* u infikovaných zvířat starších 3 let (věkové kategorie C a D)

Kat. /No.	LN		Slezina Tkáň	Játra		Jejunum I		Jejunum II		Ileocaecum		Děloha Tkáň	Plod		Vemeno			V
	Podč.	Plic		Tkáň	LN	M	LN	M	LN	M	LN		Játra	M	Tkáň	LN	Mléko	
C/1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	NT	NT	-	-	-	+
C/2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+++	-	-	-	-	-
C/3	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	++	-	NT	NT	+++	-	-	-
C/4	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++	-	-	NT	NT	-	-	NT	-
C/5	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	NT	NT	-	-	-	-
C/6	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+++	-	-	NT	NT	-	-	-	-
C/7	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+++	+++	-	-	-	-	-	-	+
C/8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	NT	NT	-	-	-	-
C/9	-	-	-	-	-	-	-	+	+++	-	+++	+	-	-	-	-	-	++
C/10	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
C/11	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++
C/12	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-*	-*	-	-	NT	+
C/13	-	-	-	-	-	++	+++	+	++	++	+++	-	NT	NT	-	-	-	-
C/14	-	-	-	-	-	+++	++	+++	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
C/15	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	NT	NT	-	-	-	-
C/16	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	NT	NT	-	-	-	-
C/17	-	-	-	-	-	-	++	+	++	-	+++	-	NT	NT	-	-	-	-
C/18	-	-	-	-	-	+++	-	-	+	+++	-	-	NT	NT	-	-	-	+
D/1	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	NT	NT	-	-	NT	-
D/2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D/3	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT	-	-	-	-

No. = číslo zvířete, podč. = podčelistní mízní uzlina, LN = mízní uzlina, M = sliznice, I = kraniální úsek střeva, II = kaudální úsek střeva, V = výkaly, C = věková kategorie C (3,1 – 8,0 roky), D = věková kategorie D (nad 8,0 let), + = slabá infekce (do 10 CFU), ++ = středně silná infekce (11 - 30 CFU), +++ = silná infekce (více než 30 CFU), *vyšetřeny dva plody-dvojčata, NT = nevyšetřeno

5.1.7.2. Výsledky kultivace vzorků orgánů

MAP bylo kultivační metodou detekováno ve tkáních 49 zvířat (37,4 %) ze 131 vyšetřených (**Tabulka 5**).

Nejvíce kultivačně pozitivních zvířat pocházelo z věkové kategorie B (21; 43 %) a C (18; 36,7 %). Nejmladší věková kategorie zahrnovala sedm (14,3 %) a nejstarší tři (6,1 %) kultivačně pozitivní zvířata. Silná infekce (+++) byla rovněž nejvíce zastoupena v kategorii B (10; 47,6 % zvířat ze skupiny B) a C (10; 55,6 % zvířat ze skupiny C), zatímco v kategorii A a D převažovala slabá infekce tkání (**Graf 1**).

Statisticky velmi významný rozdíl ($P < 0,01$) v prevalenci infekce byl zjištěn mezi věkovými skupinami B a D. Statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) byl prokázán mezi věkovými skupinami A a B a mezi věkovými skupinami C a D. Mezi věkovými skupinami B a C nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl (**Tabulka 7**).

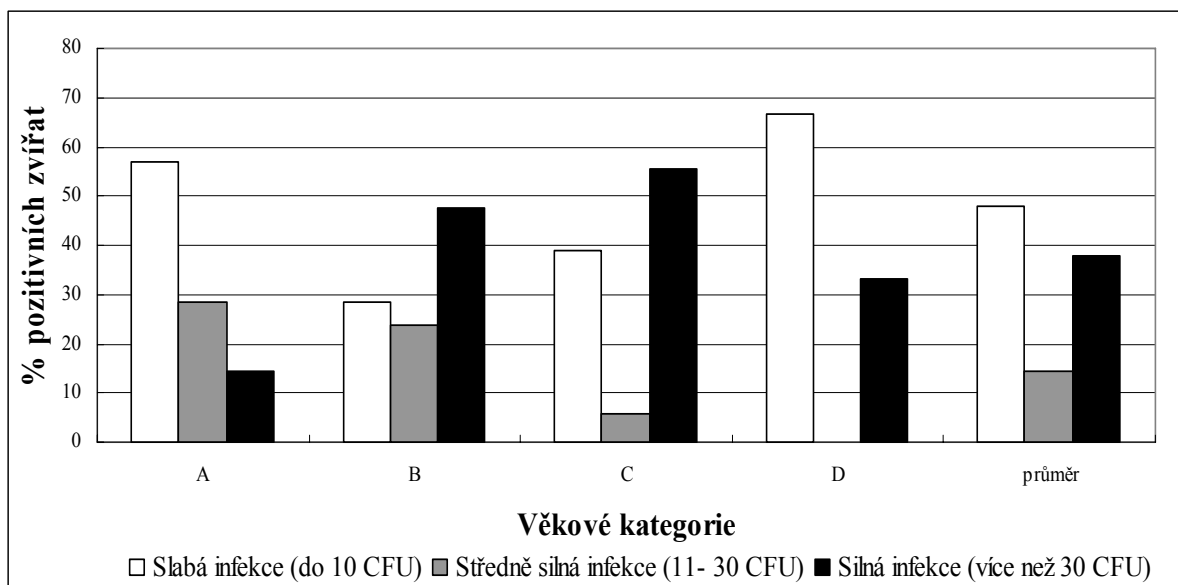
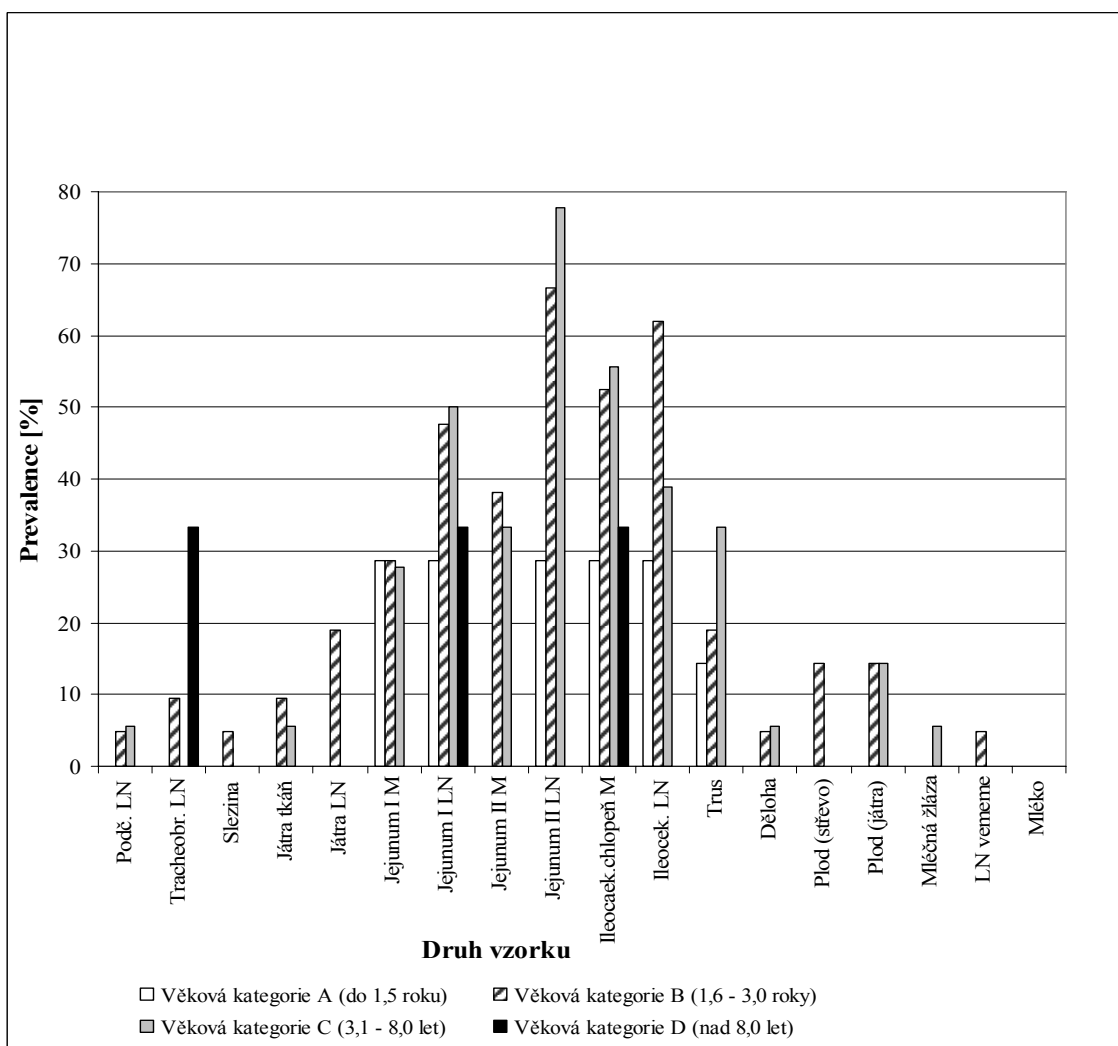
Tabulka 7: Významnost rozdílů v prevalenci *MAP* infekce dle věkových kategorií

Věková kategorie (roky)	A ($\leq 1,5$)	B (1,6 – 3,0)	C (3,1 – 8,0)	D ($\geq 8,1$)
A	NT	+	-	-
B	+	NT	-	++
C	-	-	NT	+
D	-	++	+	NT

+ = $P < 0,05$ (statisticky významné), ++ = $P < 0,01$ (statisticky velmi významné), - = $P > 0,05$ (statisticky nevýznamné), NT = netestováno

Nejčteněji bylo *MAP* kultivováno ze vzorků tenkého střeva (48; 98,0 % zvířat z pozitivních ve tkáních), v nichž byl zároveň prokázán i nejčtenější silný (+++) nárůst *MAP* (19; 38,8 % infikovaných zvířat) (**Tabulka 6a,b, Graf 2**). Naopak, nejméně pozitivních nálezů bylo u vzorků sleziny (1 zvíře) a vemene (2 zvířata). U věkové kategorie A všechny pozitivní vzorky pocházely z tenkého střeva nebo z výkalů (**Tabulka 6a**).

Pohlavní orgány plemenného býka byly kultivačně negativní.

Graf 1: *MAP* pozitivní zvířata v jednotlivých věkových kategoriích s vyjádřením intenzity infekceGraf 2: Znárodnění prevalence *MAP* v různých orgánech s ohledem na věkové kategorie

Intenzita infekce tkání u zvířat vylučujících *MAP* výkaly

Z 11 ve výkalech pozitivních zvířat byla: u třech (27,3 %) zjištěna slabá infekce tkání a slabé vylučování *MAP* výkaly; u pěti (45,5 %) silná infekce tkání a slabá izolace ve výkalech; u dvou (18,2 %) silná infekce tkání a středně silné vylučování *MAP* výkaly a u jednoho zvířete (9,1 %) jak silná infekce tkání, tak silné vylučování *MAP* výkaly (**Tabulka 8**).

U osmi ve výkalech pozitivních zvířat (72,7 %) byly infikovány pouze tkáně gastrointestinálního traktu. U třech zvířat (27,3 %) byly infikovány také extraintestinální tkáně, včetně plodu u jednoho z nich (**Tabulka 9**).

Tabulka 8: Přehled zvířat pozitivních ve tkáních vs. ve výkalech s vyjádřením intenzity infekce

<i>MAP</i> ve výkalech		<i>MAP</i> ve tkáních		
		+	++	+++
Pozit.	+	3	0	5
	++	0	0	2
	+++	0	0	1
Neg.		17	10	11

Tabulka 9: Intenzita infekce tkání u zvířat vylučujících *MAP* výkaly

Věková kategorie	<i>MAP</i> ve výkalech	<i>MAP</i> ve tkáních	Infikované tkáně
A	+	+	GIT
B	+	+++	GIT
B	+	+++	GIT
B	+	+++	GIT
			EXIT
B	++	+++	GIT
			EXIT
C	+	+++	GIT
C	+	+	GIT
C	+++	+++	GIT
C	++	+++	GIT
			EXIT
C	+	+++	GIT
C	+	+	GIT

GIT – gastrointestinální trakt, EXIT – extraintestinální tkáně, + = slabá infekce (do 10 CFU), ++ = středně silná infekce (11- 30 CFU), +++ = silná infekce (více než 30 CFU)

5.1.7.3. Výsledky kultivace tkání plodů

Z celkového počtu 36 vyšetřených plodů pocházelo 18 od 16 infikovaných matek (dvě krávy měly dvojčata; **Tabulka 5**) a 18 od neinfikovaných matek. 30 z vyšetřovaných plodů pocházelo od matek spadajících do věkové kategorie B a C.

MAP bylo izolováno z tkání dvou plodů. Jeden plod (6,5 měsíců starý) byl silně infikován v tkáni jater. Pocházel od matky z věkové kategorie C, slabě infikované v ileocaekální mízní uzlině (**Tabulka 6b**).

Z druhého plodu (8 měsíců starého) bylo *MAP* silně izolováno jak z tkáně jater, tak ze sliznice střeva. Tento plod pocházel od matky, která patřila do věkové kategorie B a byla kultivací zjištěna jako silně infikovaná v mnoha tkáních a současně vylučující *MAP* výkaly (**Tabulka 6a**). Za významný lze považovat fakt, že již jeden pozitivní potomek byl u této matky dříve zjištěn.

5.1.7.4. Výsledky kultivace vzorků mléka

Kultivačně bylo vyšetřeno mléko 69 krav s negativním výsledkem (**Tabulka 5**).

5.1.7.5. Výsledky kultivace vzorků vnějšího prostředí

Kultivační vyšetření vzorků z obou odběrů (1. odběr před radikální likvidací a 2. odběr za dva měsíce po vyprázdnění stájí) bylo negativní.

5.1.7.6. Výsledky molekulární analýzy původce paratuberkulózy

Metodou IS900 PCR byl potvrzen původce paratuberkulózy *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Metodou RFLP byl u všech izolátů identifikován kmen B-C1.

5.1.8. Incidence infekce původcem paratuberkulózy u dojnic

Z celkového počtu 69 dojnic stáda byla infekce prokázána u 33 (47,8 %) dojnic. Nejvíce pozitivních dojnic bylo zastoupeno ve skupině s jednou, dvěma a třemi laktacemi: z celkového počtu 16 dojnic na první laktaci bylo 13 pozitivních (81,3 %); z celkového počtu 17 dojnic na druhé laktaci bylo 10 pozitivních (58,8 %) a z celkového počtu sedmi dojnic na třetí laktaci byly čtyři (57,1 %) pozitivní (**Tabulka 10**).

Z 13 pozitivních dojnic na první laktaci byla u 9 prokázána silná infekce tkání (**Tabulka 11**).

Tabulka 10: Pořadí laktace v době vyřazení dojnic (radikální likvidace stáda)

PPL	Počet dojnic na dané laktaci	Pozitivní dojnice		Negativní dojnice	
		n	%	n	%
1.	16	13	81,3	3	18,7
2.	17	10	58,8	7	41,2
3.	7	4	57,1	3	42,9
4.	7	0	0	7	100,0
5.	8	2	25,0	6	75,0
6.	3	1	33,3	2	66,7
7.	2	0	0	2	100,0
8.	4	2	50,0	2	50,0
9.	3	0	0	3	100,0
10.	2	1	50,0	1	50,0
Celkem	69	33	47,8	36	52,2

PPL – pořadí poslední laktace v době vyřazení dojnice

Podíl pozitivních dojnic, které byly v době vyřazení na první laktaci (81,3 %) je statisticky významně vyšší ($P = 0,0024$) než podíl pozitivních dojnic na ostatních laktacích (37,7 %).

Tabulka 11: Intenzita infekce u pozitivních dojnic v době vyřazení

PPL	Počet pozitivních dojnic	Intenzita infekce		
		+	++	+++
1.	13	1	3	9
2.	10	4	1	5
3.	4	2	1	1
5.	2	1	0	1
6.	1	0	0	1
8.	2	2	0	0
10.	1	1	0	0
Celkem	33	11	5	17

PPL – pořadí poslední laktace v době vyřazení dojnice

U pozitivních dojnic, které byly vyřazeny na první laktaci, byl statisticky významně vyšší ($P = 0,0402$) výskyt silných infekcí v porovnání s pozitivními dojnicemi na ostatních laktacích.

5.1.9. Epizootologická analýza

Šetřením byly v chovu zjištěny nedostatky ve výživě (zkrmováno směsné mléko bez tepelné úpravy) a způsobu odchovu telat (kontakt s dospělými jedinci).

Při seřazení infikovaných zvířat podle data narození (s důrazem na měsíc narození) je zřejmý vliv epizootologických rizik na incidenci infekce v jednotlivých měsících (**Tabulka 12**).

Tabulka 12: Výskyt infekce ve vztahu k měsíci narození

Rok	Měsíc												Celkem
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1992												2	2
1993	1												1
1996											1		1
1997			1							1			2
1999							1						1
2000		1					1	4	1			2	9
2001	2					1		1	1	1	1	1	8
2002	3			1		2		2	4		2	1	15
2003		2		1	2	1							6
2004						1	2			1			4
													49

narození pozitivního zvířete/zvířat,
 žádné pozitivní zvíře

5.1.10. Ekonomické konsekvence paratuberkulózy

5.1.10.1. Náklady na diagnostiku a veterinární zákroky

Náklady na diagnostiku představují značnou část celkových nákladů při řešení výskytu paratuberkulózy v podniku. Jednu z položek zde tvoří náklady na veterinární činnost, včetně probátní symptomatické terapie před odhalením nákazy.

Druhou položku představují náklady spojené s laboratorní diagnostikou, kterou zajišťují veterinární ústavy. Za sérologické vyšetření jednoho vzorku je účtováno cca 30 až 50 Kč. Za kultivační vyšetření výkalů včetně preparace a mikroskopického vyšetření je účtováno cca 370 Kč. Za kultivační vyšetření orgánů včetně preparace a mikroskopického vyšetření je účtováno cca 340 Kč. Uvedené ceny jsou smluvní.

V Metodického návodu SVS ČR č. 6/2001 je doporučeno vyšetřovat skot kultur výkalů zvířat starších 18 měsíců dvakrát ročně a komplexní laboratorní analýza orgánů trávicího traktu

za účelem konfirmace onemocnění paratuberkulózou u zvířat klinicky podezřelých nutně odporažených, utracených či uhynulých.

Náklady na diagnostiku v chovu S uvádíme pouze v obecné rovině, platné pro všechny infikované chovy, neboť v tomto chovu se na zmíněných nákladech spoluúčastnil VÚVeL a Mze ČR v rámci výzkumných projektů.

5.1.10.2. Snížení jatečné hodnoty zvířat

Maso a orgány většiny zvířat chovu S byly, dle posouzení stavu jatečně opracovaného těla, zařazeny do výrobních kategorií s nízkou výkupní cenou.

Ze 131 zvířat, porážených v rámci radikální likvidace stáda, bylo na jatkách maso a orgány posouzeno jako:

- a. nepoživatelné u 42 zvířat (32 %);
- b. podmíněně požitelné výrobní u 52 zvířat (40 %);
- c. požitelné bez omezení u 37 zvířat (28 %)

Majitel stáda skotu plemene Jersey v cenových relacích roku 2004*, zaplatil za odporažení stáda skotu 197 450,- Kč bez DPH (= cena porážky). Zvířata byla vykoupena „v mase“ za celkovou částku 86 750,- Kč. Likvidace stáda představovala pro majitele finanční ztrátu ve výši více než 110 700,- Kč (nebylo zahrnuto DPH).

* kráva – 2000 Kč, jalovice – 1250 Kč, tele – 400 Kč

5.1.10.3. Ztráty ušlého zisku

Značnou ztrátu pro chovatele představuje tzv. ušlý zisk, tedy částka, o níž majitel přichází v důsledku ukončení mléčné produkce stáda. Po radikální likvidaci byla v případě námi sledovaného stáda určena doba pěti měsíců, během kterých musí být stájové objekty prosty zvířat. Po uplynutí této doby může majitel pořídit nové stádo vysokobřezích zvířat (7. měsíc březosti) a tedy se znovu zahájením produkce mléka je možno počítat za 8 až 9 měsíců.

Pro stádo skotu chovu S byly přiděleny mléčné kvóty na produkci mléka 1 000 l za den, což činí při ceně mléka 8,20 Kč/l v roce 2004, celkem 246 000,- Kč měsíčně.

Potencionální výše ušlého zisku za 8 měsíců představuje částku 1 968 000,- Kč.

Majiteli byly mléčné kvóty na toto období po dohodě pozastaveny.

5.1.10.4. Náklady na náhradu vyřazených zvířat

Náklady na zakoupení nových zvířat tvoří také podstatnou část z celkových nákladů při ozdravování chovu od paratuberkulózy. Majitel chovu S založil nové stádo nákupem 50 vysokobřezích jalovic plemene České strakaté, při ceně 20 tisíc Kč za jednu jalovici.

5.1.10.5. Obchodní omezení a ztráta chovatelské hodnoty zvířat

Stádo skotu plemene Jersey bylo posouzeno soudním znalcem jako vyrovnané, chované ve velmi dobrých chovatelských podmínkách. Zvířata odpovídala plemennému standardu, konstitučně pevná, s dobrým růstem a vývinem. Krávy byly oceněny na vysokou plemennou hodnotu (kg mléka, bílkovin, vysoký obsah mléčných složek) (**Tabulka 13**).

Paratuberkulóza je nákaza uvedená v seznamu B podle klasifikace OIE. Vztahují se ni protinákazová opatření při vyhlášení ohniska nákazy, ze kterých plynou nepřímé ztráty pro chov. Nejzávažnější je především zákaz přemísťování zvířat určených k dalšímu chovu do stád prostých nákazy a stád ozdravovaných. V konečném efektu dochází ke snížení, příp. úplné ztrátě chovatelské hodnoty zvířat, která se stávají pouze užitkovou kategorií.

Majitel chovu S plánoval prodej jalovic do Dánska a na Slovensko.

Tabulka 13: Ekonomické stanovení plemenné hodnoty zvířat

Kategorie	n	Hodnota zvířete (tis.)	celkem
Matka plemenných býků	3	50	150 000
Plemenný býk	1	60	60 000
Plemenná kráva kategorie A	72	32	2 304 000
Plemenná kráva kategorie B	10	15	150 000
Plemenná kráva kategorie C	4	5	20 000
Jalovice březí	20	25	500 000
Jalovice mladé	17	15	255 000
Telata jalovičky	13	3	39 000
Celkem			3 478 000

kategorie A – bez závažné vady; kategorie B – nižší užitkovost, plodnost; kategorie C – na vyřazení; n – počet zvířat v kategorii

5.1.10.6. Náklady spojené s asanací stájových prostor

Náklady na mechanické očištění a desinfekci stájových prostor činily 106 196,- Kč. Dřevěné boudy pro telata v počtu 20 kusů (4 900,- Kč/ks) byly spáleny. Jejich celková hodnota byla 98 000,- Kč.

5.1.10.7. Náklady spojené s asanací a obnovou pastevního areálu

Náklady na obnovu pastvin byly vyčísleny na 283 731,- Kč a náklady na obnovu oplocení pastevního areálu tvořily 163 400,- Kč.

5.1.10.8. Náklady na likvidaci krmiv, steliva, chlévské mrvy

Náklady spojené s likvidací krmiv kompostováním činily 471 210,- Kč.

Náklady spojené s likvidací steliva činily 39 066,- Kč a náklady spojené s likvidací chlévské mrvy činily 11 000,- Kč.

5.1.10.9. Ovlivnění mléčné užitkovosti a reprodukční výkonnosti

Průměrné hodnoty a rozmezí ukazatelů mléčné užitkovosti, jakosti mléka a reprodukční výkonnosti pozitivních a kontrolních dojnic znázorňují **Tabulky 14 a 15**.

Zhodnocením jakostních znaků mléka, výše užitkovosti a reprodukčních parametrů u dojnic na první laktaci jsme zjistili statisticky významně nižší obsah tuku a bílkoviny v mléce u pozitivních dojnic v porovnání s kontrolní skupinou (**Tabulka 16**). Ostatní sledované znaky byly bez statistické významnosti.

Tabulka 16: Srovnání pozitivní a kontrolní skupiny na 1. laktaci

Parametr	Pozitivní zvířata		Kontrolní skupina		Průměrná diference (Kontr-Neg)	P-value *	Významnost rozdílů
	n	Průměr	n	Průměr			
Tuk	37	5,794	20	6,325	-0,531	0,0154	+
Bílkovina	37	3,985	20	4,153	-0,167	0,0148	+
Laktóza	37	4,761	20	4,810	-0,049	0,3043	-
Kg mléko	21	3997	9	4297	-300	0,2794	-
Kg bílk	21	157,3	9	170,1	-12,8	0,2255	-
Počet ins.	39	1,538	20	1,450	0,088	0,5760	-
Ins. interv.	39	87,3	20	81,2	6,1	0,4898	-
SP	39	111,9	20	100,7	11,2	0,3337	-

+ = P < 0,05 (statisticky významné), - = P > 0,05 (statisticky nevýznamné)

U pozitivních dojnic na druhé laktaci byl zjištěn statisticky významně nižší obsah mléčného tuku v porovnání s kontrolní skupinou (**Tabulka 17**).

Tabulka 17: Srovnání pozitivní a kontrolní skupiny na 2. laktaci

Parametr	Pozitivní zvířata		Kontrolní skupina		Průměrná diference (Kontr-Neg)	P-value *	Významnost rozdílů
	n	Průměr	n	Průměr			
Tuk	25	5,797	22	6,291	-0,494	0,0339	+
Bílkovina	25	4,142	22	4,295	-0,153	0,0958	-
Laktóza	25	4,720	22	4,723	-0,003	0,9518	-
Kg mléko	8	4671	8	4842	-171	0,6995	-
Kg bílk	8	193,1	8	195,0	-1,9	0,9246	-
Mezidobí	27	397,6	23	384,4	13,2	0,5130	-
Počet ins.	28	1,393	20	1,250	0,143	0,4882	-
Ins. interv.	28	93,2	20	90,2	3,0	0,8440	-
SP	27	116,9	20	105,3	11,6	0,5975	-

+ = P < 0,05 (statisticky významné), - = P > 0,05 (statisticky nevýznamné)

Mezi skupinou pozitivních a kontrolních dojnic na třetí a vyšší laktaci nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v žádném ze sledovaných znaků (**Tabulka 18**).

Tabulka 18: Srovnání pozitivní a kontrolní skupiny na 3. a vyšší laktaci

Parametr	Pozitivní zvířata		Kontrolní skupina		Průměrná diference (Kontr-Neg)	P-value *	Významnost rozdílů
	n	Průměr	n	Průměr			
Tuk	23	6,317	33	6,526	-0,209	0,2153	-
Bílkovina	23	4,358	33	4,439	-0,081	0,2965	-
Laktóza	23	4,713	33	4,670	0,043	0,2104	-
Kg mléko	15	4877	14	4884	-7	0,9813	-
Kg bílk	15	210,6	14	210,2	0,4	0,9761	-
Mezidobí	28	418,2	45	384,0	34,2	0,0791	-
Počet ins.	27	1,852	42	1,690	0,162	0,5368	-
Ins. interv.	27	83,2	42	71,6	11,6	0,1701	-
SP	27	134,0	42	108,1	25,9	0,1548	-

+ = P < 0,05 (statisticky významné), - = P > 0,05 (statisticky nevýznamné)

Servis perioda nad limitní hodnotu (90 dní) byla zjištěna u 55 (59,1 %) pozitivních a u 36 (43,9 %) negativních dojnic (**Tabulka 19**).

Tabulka 19: Rozdělení dojnic do jednotlivých intervalů dle délky servis periody

Interval		Do 40	41 - 75	76 - 90	91 - 120	Nad 121	Celkem
Dojnice							
pozitivní	Počet	4	22	12	14	41	93
	%	4,3	23,7	12,9	15,1	44,1	100,0
kontrolní	Počet	2	27	17	11	25	82
	%	2,4	32,9	20,7	13,4	30,5	100,0

Ekonomické zhodnocení ztrát při servis periodě nad limitní hodnotu (90 dní) znázorňuje **Tabulka 20**. Vypočítaná průměrná ztráta na dojnici při pozitivním nálezu je přibližně dvojnásobně vyšší oproti průměrné ztrátě při nálezu negativním.

5.1.10.10. Zvýšená incidence jiných onemocnění

Zvýšený výskyt poporodních paréz od počátku založení stáda byl vysvětlován dědičnou dispozicí plemene Jersey k tomuto zdravotnímu problému. Jiné zdravotní potíže pozorovány nebyly.

Tabulka 14: Produkční ukazatele plemenic chovu S

Pořadí laktace	Skupina	Kg mléka			Tuk			Bílkovina			Laktóza		
		průměr	min.	max.	průměr	min.	max.	průměr	min.	max.	průměr	min.	max.
1	P	3997	2867	5165	5,79	3,97	7,00	3,99	3,36	4,41	4,76	4,10	5,10
	K	4297	3152	5278	6,33	5,00	7,10	4,15	3,80	4,50	4,81	4,50	5,20
2	P	4671	3900	5672	5,80	4,35	7,24	4,14	3,48	4,78	4,72	4,40	5,00
	K	4842	2883	6638	6,29	4,70	7,40	4,30	3,90	4,90	4,72	4,30	5,00
≥ 3	P	4877	3146	6197	6,32	5,20	7,32	4,36	3,80	5,33	4,71	4,50	5,00
	K	4884	3734	6165	6,53	5,00	7,50	4,44	3,90	4,80	4,67	4,40	4,90

P – pozitivní, K - kontrolní

Tabulka 15: Reprodukční ukazatele plemenic chovu S

Pořadí laktace	Skupina	Mezidobí			Inseminační interval			Servis perioda		
		průměr	min.	max.	průměr	min.	max.	průměr	min.	max.
1	P	-	-		87,3	38	198	111,9	38	220
	K	-	-		81,2	42	158	100,7	42	196
2	P	397,6	314	648	93,2	37	254	116,9	37	369
	K	384,4	318	543	90,2	42	261	105,3	42	261
≥ 3	P	418,2	282	616	83,2	30	182	134,0	49	311
	K	384,0	226	603	71,6	29	143	108,1	29	326

P – pozitivní, K - kontrolní

Tabulka 20: Ekonomické ocenění ztrát při prodloužené servis periodě (chov S)

Pořadí laktace	Dojnic celkem	Průměrná délka SP	Pozitivní dojnice						Kontrolní dojnice					
			Pozitivních celkem	Pozitivní se SP nad 90 dní	Průměrná délka SP	Součet dnů SP nad průměrnou limitní hodnotu 90 dní	Ekonomické ocenění ztrát (Kč)*	Průměrná ztráta na pozitivní dojnici (Kč)	Kontrolní celkem	Kontrolní se SP nad 90 dní	Průměrná délka SP	Součet dnů SP nad průměrnou limitní hodnotu 90 dní	Ekonomické ocenění ztrát (Kč) *	Průměrná ztráta na negativní dojnici (Kč)
1	59	108	39	26	112	858	42900 – 60060	1100 – 1540	20	11	101	220	11000 – 15400	550 – 770
2	47	112	27	14	117	729	36450 – 51030	1350 – 1890	20	8	105	300	15000 – 21000	750 – 1050
≥ 3	69	118	27	15	134	1188	59400 - 83160	2200 - 3080	42	17	108	756	37800 - 52920	900 - 1260

* ekonomická ztráta prodloužením SP o den – 50 – 70 Kč

5.1.11. Zhodnocení ozdravovacího programu

Eliminační metoda ozdravování, která byla nejprve v chovu S zahájena, spočívala v pravidelném testování (kultivace výkalů zvířat starších 18 měsíců) a odstraňování kultivačně a klinicky pozitivních zvířat. Dalším bodem byla náprava zjištěných nedostatků týkajících se výživy telat a kontaktu mladých zvířat s dospělými. Ačkoliv odstranění těchto rizikových faktorů proběhlo ihned po doporučení, nemělo již výraznější vliv na prevalenci nákazy, která v té době, podle pozdějších zjištění, postihovala zřejmě značnou část stáda. Separovaný chov mladých a dospělých jedinců má klíčový význam pro získávání zdravých zvířat pro budoucí chov.

U paratuberkulózy je ovšem znám i vertikální přenos, tedy z matky na potomka *in utero*. Proto je doporučeno potomky nepoužívat pro další chov a pokud možno je vyřadit z chovu (např. výkrm těchto zvířat).

V případě tohoto chovu byla velmi podstatným problémem možnost náhrady vyřazovaných zvířat, neboť plemeno Jersey není v ČR tak rozšířené jako jiná dojená plemena. Při vyřazování pouze omezeného počtu zvířat v průběhu roku by bylo možné uvažovat o náhradě těchto zvířat z vlastních zdrojů. V chovu S ovšem došlo k vyřazení 29 zvířat v období od ledna do října kalendářního roku 2004.

S ohledem na uvedené skutečnosti, bylo navrženo přistoupit k radikální likvidaci stáda.

Z celého, radikálně likvidovaného stáda čítajícího 131 zvířat, bylo kultivačně pozitivních na paratuberkulózu 49 zvířat (37,4 %) všech věkových kategorií, tj. jak zvířata do jednoho roku věku, tak zvířata z nejstarší věkové kategorie (12 let), která pocházela z původního importu z Dánska (**Tabulka 5**).

Vzhledem k takto výraznému promoření chovu, byla volba radikální likvidace jediné možné řešení.

5.2. Tlumení nákazy v chovu C

5.2.1. Průběh nákazy v chovu C

Nákup zvířat z Holandska proběhl v roce 1994 a nákup z Francie v následujícím roce. Oba nákupy byly uskutečněny pod veterinárním dohledem, v průběhu stanovené karantény bylo v rámci zdravotních zkoušek provedeno sérologické vyšetření zvířat na paratuberkulózu s negativním výsledkem.

5.2.2. Vzplanutí nákazy a suspektní diagnostika

Výskyt průjmových stavů byl pozorován od začátku roku 2002. Nejprve se jednalo spíše o ojedinělé případy, střídavého charakteru, mírného stupně, které byly etiologicky vztahovány k předpokládaným dietetickým závadám (bobová siláž).

Později se ovšem začaly vyskytovat úporné průjmy trvalého rázu a také další klinické příznaky – ztráta kondice až kachexie, postupně těžké dehydratace, otoky v mezisaniči a docházelo ke zvyšování počtu nutných porážek a úhynů. Na základě těchto příznaků bylo vysloveno podezření na paratuberkulózu.

5.2.3. Laboratorní diagnostika

První laboratorní vyšetření na paratuberkulózu v roce 2002 bylo podle sdělení tehdejšího obvodního veterinárního lékaře negativní. Při trvajících zdravotních problémech bylo vyšetření zopakováno v listopadu 2003 s pozitivním výsledkem mikroskopického a následně kultivačního vyšetření výkalů.

Na počátku roku 2004 byla navázána spolupráce s Výzkumným ústavem veterinárního lékařství v Brně. Byl vytvořen program pro eliminační metodu ozdravování chovu C, který sestával ze čtyř plošných kultivačních vyšetření výkalů zvířat starších 18 měsíců v průběhu kalendářního roku.

5.2.4. Epizootologická analýza a posouzení rizik

Mléčná farma je řešena jako volná boxová stáj s bezstelivovým provozem.

Telata a mladé kategorie skotu jsou relativně odchovávány bez kontaktu s dospělými zvířaty. Telata jsou ustájena ve venkovních individuálních boxech situovaných u komunikace, kterou projíždí zemědělská technika.

Podstatným problémem v tomto chovu bylo pozdní zahájení ozdravování, kdy zvířata s již rozvinutými klinickými příznaky zůstávala v chovu a při systému volného ustájení, šířila původce paratuberkulózy mezi ostatními zvířaty. Z anamnestických údajů také vyplynulo, že takto nemocná, průjmem stížená zvířata byla odsouvána, při chybějícím podezření na tuto nákazu, na pastvinu za účelem „zlepšení“ zdravotního stavu, kde se po různě dlouhou dobu pohybovala a šířila zárodky.

5.2.5. Eliminační metoda tlumení paratuberkulózy

V chovu C byla zvolena eliminační metoda ozdravování, založená na principu pravidelného vyšetřování výkalů zvířat starších 18 měsíců a sledování zdravotního stavu zvířat veterinárním lékařem a chovatelem. V ozdravovacím plánu bylo určeno, že kultivačně pozitivní zvířata je nezbytné vyřadit, v co nejkratší době po zjištění výsledku. Také zvířata s charakteristickými příznaky pro paratuberkulózu je nutné vyřadit, co nejdříve a laboratorně došetřit vzorky jejich trávicího traktu.

Nedílnou součástí ozdravovacího postupu je samozřejmě průběžné mechanické čištění stájových objektů mléčnic, připraven krmiv apod., včetně následné dezinfekce.

5.2.5.1. Závady v dodržování ozdravovacího postupu

Při zpětném vyhodnocování výsledků plošných kultivačních vyšetření bylo zjištěno, že chovatel neplní stanovená opatření vyřazovat odhalené kultivačně pozitivní jedince z chovu. V některých případech se jednalo o zvířata velmi silně vylučující *MAP*, která byla držena v chovu různě dlouhé období. K jejich vyřazení přistoupil chovatel až poté, kdy se objevily klinické symptomy paratuberkulózy – průjem, edémy v mezisaniči, rychle postupující chřadnutí.

5.2.6. Výsledky laboratorních vyšetření

5.2.6.1. Výsledky kultivace vzorků výkalů

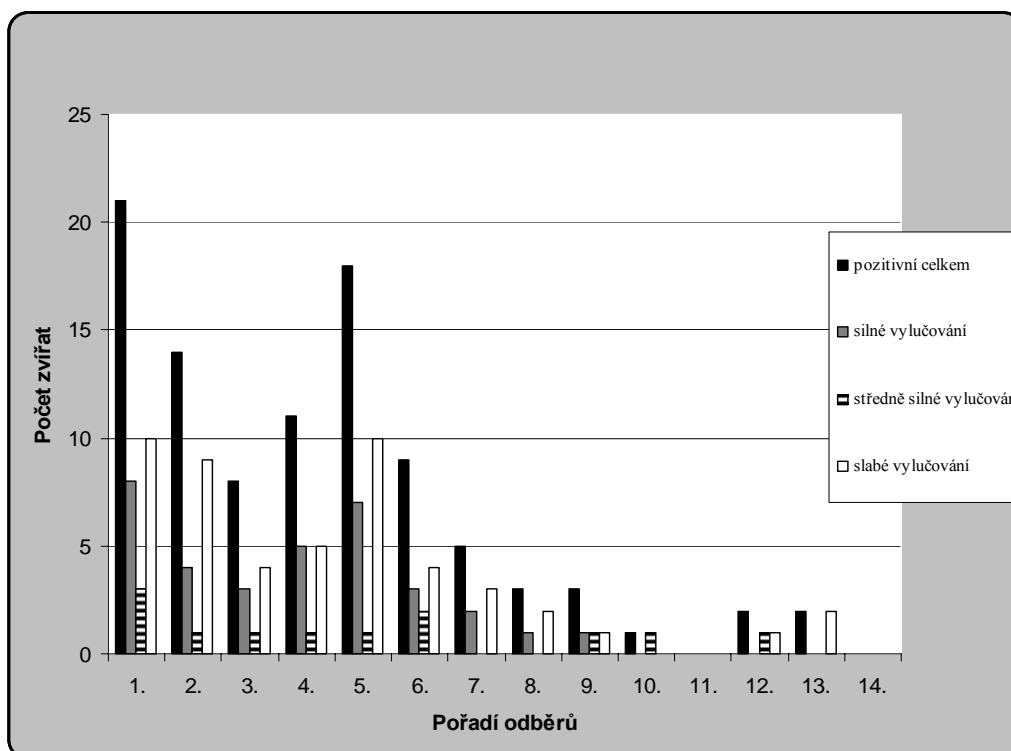
Od zahájení ozdravovacího programu bylo uskutečněno celkem 14 plošných vyšetření výkalů (**Tabulka 21, Graf 3, 4**). Nejvyšší záchyt kultivačně pozitivních zvířat byl v prvním plošném vyšetření, kdy bylo zjištěno 21 pozitivních zvířat (11 %). Takto vysoký záchyt vylučovatelů je v případě prvního plošného vyšetření běžný. V následujících třech plošných vyšetřeních je patrný pokles pozitivních výsledků (**Graf 3, 4**). Páté kontrolní vyšetření přineslo opět vysoký záchyt zvířat vylučujících *MAP* výkaly, kdy z vyšetřovaných 215 zvířat bylo 18 pozitivních (8,4 %). Důvody pro takto vysoký záchyt mohou být různé, např. může jít o nedodržování některých bodů ozdravovacího programu jako je včasné vyřazování zvířat vylučujících *MAP* výkaly.

Jedenácté kultivační vyšetření neprokázalo žádné zvíře vylučující *MAP*.

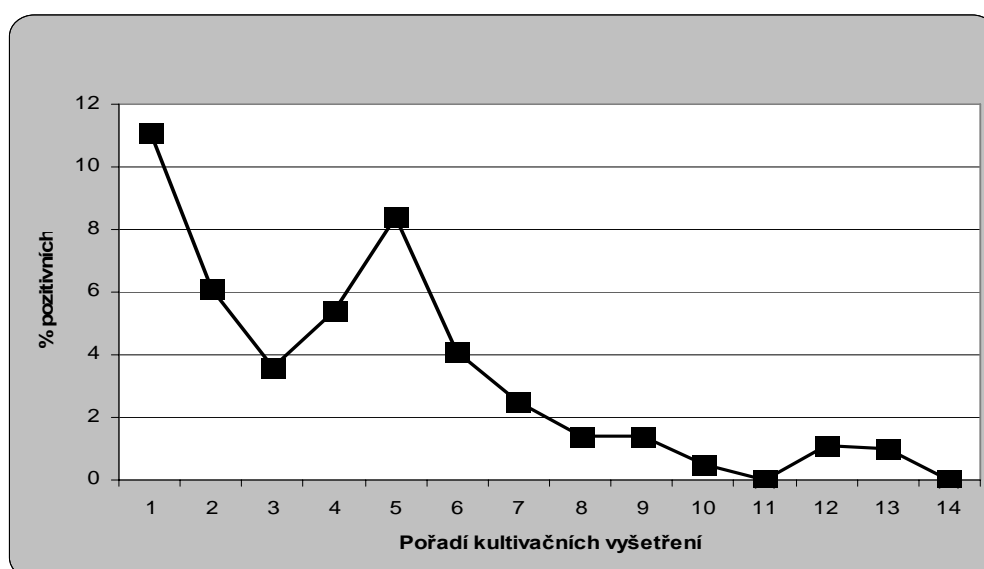
Dvanácté a třinácté kultivační vyšetření opět potvrdilo nárůst *MAP* ve vzorcích výkalů dvou zvířat. Čtrnáctým vyšetřením, v němž nebyl prokázán žádný vylučovatel *MAP* výkaly, bylo ze strany chovatele ukončeno plošné kultivační vyšetřování zvířat (prosinec 2007).

Většina zvířat, u nichž bylo prokázáno vylučování původce paratuberkulózy výkaly, byla tři až pět let stará.

Graf 3: Přehled plošných kultivačních vyšetření výkalů s vyjádřením intenzity vylučování *MAP*



Graf 4: Vývoj prevalence infekce v chovu C v průběhu let 2004 až 2007



Tabulka 21: Plošná kultivační vyšetření výkalů

Vyšetření trusu	Datum	Vyšetřená zvířata			Intenzita vylučování					
					Silná		Střední		Slabá	
		n	Pozitivní	%	n	%	n	%	n	%
1.	01/ 2004	190	21	11,1	8	38,1	3	14,3	10	47,6
2.	06/ 2004	229	14	6,1	4	28,6	1	7,1	9	64,3
3.	12/ 2004	223	8	3,6	3	37,5	1	12,5	4	50,0
4.	03/ 2005	202	11	5,4	5	45,5	1	9,1	5	45,5
5.	06/ 2005	215	18	8,4	7	38,9	1	5,6	10	55,5
6.	09/2005	222	9	4,1	3	33,3	2	22,2	4	44,4
7.	12/2005	200	5	2,5	2	40,0	0	0	3	60,0
8.	03/2006	209	3	1,4	1	33,3	0	0	2	66,7
9.	06/2006	220	3	1,4	1	33,3	1	33,3	1	33,3
10.	09/2006	198	1	0,5	0	0	1	100,0	0	0
11.	12/2006	198	0	0	0	0	0	0	0	0
12.	03/2007	179	2	1,1	0	0	1	50,0	1	50,0
13.	06/2007	193	2	1,0	0	0	0	0	2	100,0
14.	12/2007	221	0	0	0	0	0	0	0	0
Celkem		2899	97	3,5	34	36,0	12	12,6	51	51,6

5.2.6.2. Výsledky kultivačního a PCR vyšetření vzorků mléka

Kultivační vyšetření individuálních a bazénových vzorků mléka bylo negativní.

Vyšetření mléčných filtrů bylo kultivačně pozitivní u jednoho mléčného filtru (velmi slabý nárůst na všech třech kultivačních půdách).

Molekulárními metodami byly vyšetřeny individuální směsné vzorky 13 dojnic – vylučovatelek *MAP* výkaly (**Tabulka 22**). IS900 PCR určilo devět pozitivních vzorků. Stejně vzorky byly potvrzeny s využitím sekvence F57.

Tabulka 22: Kultivační a PCR vyšetření u vylučovatelek *MAP* výkaly

Dojnice	*	Kultivace výkalů			Kultivace mléka				PCR 12/06
		12/06	3/07	6/07	9/06	3/07	5/07	6/07	
1	++	N	-	-	N	-	-	-	P
2	+	-	-	-	N	-	-	-	-
3	+	-	N	N	N	N	N	N	-
4	+	N	N	N	N	N	N	N	P
5	+++	N	N	N	N	N	N	N	P
6	+	N	N	N	N	N	N	N	P
7	+	N	N	N	N	N	N	N	P
8	+++	-	N	-	N	N	-	-	-
9	+++	N	+++	-	-	N	-	-	P
10	+	N	N	N	-	N	N	N	P
11	+	N	N	-	-	N	-	-	P
12	+	N	N	N	-	N	N	N	N
13	+	N	N	N	-	N	N	N	P
14	+	N	-	-	-	-	-	-	N
15	+	N	N	N	-	N	N	N	N
16	+	N	N	N	-	N	N	N	N

* - první vyšetření výkalů, na základě kterého se určily vylučovatelky, s vyjádřením intenzity infekce: + - slabá infekce; ++ - střední infekce, +++ - silná infekce, N – negativní, P – pozitivní, „-“, - nevyšetřeno

5.2.6.3. Výsledky kultivace vzorků vnějšího prostředí

Bylo uskutečněno šest odběrů, celkem 150 vzorků. Kultivačně pozitivní byl jeden vzorek z pastviny a pět vzorků kejdy ze sběrné nádrže v 1. odběru a jeden vzorek získaný stěrem z hrazení v 5. odběru.

5.2.7. Význam paratuberkulózy

Náklady na prováděnou diagnostiku, vyřazování zvířat a jejich následnou náhradu, obchodní omezení a ztráta chovatelské hodnoty zvířat jsou velmi závažným a těžkým problémem, se kterým se chov C v době ozdravování potýkal.

Náklady vynaložené na diagnostiku v rámci eliminační metody ozdravování obecně odpovídají kapitole 5.1.10.1. V chovu C byla uskutečňována čtyři plošná kultivační vyšetření výkalů ročně plus došetřování orgánů zvířat podezřelých z infekce.

Za odvoz a zpracování uhynulých či utracených zvířat asanační ústavy účtují 7,20 Kč/kg, přičemž stát přispívá částkou 5 Kč/kg. Cena za utracení nemocné krávy veterinárním lékařem se pohybuje v rozmezí 800 až 1000 Kč. V chovu C byla všechna zvířata určená k vyřazení utrácena.

Náklady vynaložené na diagnostiku a vyřazování pozitivních zvířat z chovu zpřehledňuje **Tabulka 23.**

Tabulka 23: Náklady na diagnostiku a vyřazování zvířat

P.č./rok	Vyšetřená / pozitivní	Náklady na diagnostiku (Kč) ①	Náklady za utracení (Kč)②	Asanační ústav (Kč)③	Celkem
1/2004	190/21	70 300	16 800	23 100	110 200
2/2004	229/14	*27 480	11 200	15 400	54 080
3/2004	223/8	*26 760	6 400	8 800	41 960
mezisoučet 2004		124 540	34 400	47 300	206 240
4/2005	202/11	74 740	8 800	12 100	95 640
5/2005	215/18	*25 800	14 400	19 800	60 000
6/2005	222/9	*26 640	7 200	9 900	43 740
7/2005	200/5	74 000	4 000	5 500	83 500
mezisoučet 2005		201 180	34 400	47 300	282 880
8/2006	209/3	*25 080	2 400	3 300	30 780
9/2006	220/3	*26 400	2 400	3 300	32 100
10/2006	198/1	73 260	800	1 100	75 160
11/2006	198/0	73 260	0	0	73 260
mezisoučet 2006		198 000	5 600	7 700	211 300
12/2007	179/2	66 230	1 600	2 200	70 030
13/2007	193/2	*23 160	1 600	2 200	26 960
14/2007	221/0	*26 520	0	0	26 520
mezisoučet 2007		115 910	3 200	4 400	123 510
Náklady celkem		639 630	77 600	106 700	823 930

① kulturační vyšetření výkalů 370 Kč; ② 800 Kč/utracení;

③ 1100 Kč/odvoz a zpracování jednoho kadáveru (spočítáno na 500 kg ž.h. s odečtením státní dotace 5 Kč/kg)

* odečtena státní dotace na diagnostiku 250 Kč/vyšetření

Vyřazování dojníc a jejich náhrada představuje velký problém a největší finanční zátěž pro paratuberkulózou stížený chov. V rozmezí let 2004 až 2007 bylo v chovu C z důvodu pozitivního výsledku kultivace výkalů vyřazeno 97 dojníc. Při obvyklé ceně za vysokobřeží jalovici (20 až 30 tisíc Kč) činí náklady na nákup náhradních zvířat 2 až 3 miliony Kč. Vyřazovaná zvířata byla ovšem zčásti doplňována z vlastního odchovu.

Obchodní omezení způsobují v tomto chovu další ztráty, nejcitelněji, dle chovatele, znatelné v oblasti prodeje telat býčků do výkrmu, neboť jalovičky byly ponechávány k obnově vlastního chovu.

Na základě šetření v chovu a sdělení hlavního zootechnika nebyly zaznamenány žádné změny v mléčné užitkovosti, reprodukční výkonnosti, ani zvýšený výskyt jiných zdravotních problémů.

Průměrné hodnoty a rozmezí ukazatelů mléčné užitkovosti, jakosti mléka a reprodukční výkonnosti pozitivních a kontrolních dojníc znázorňují **Tabulky 24 a 25**.

U pozitivních dojníc na první laktaci byl statisticky významně vyšší obsah laktózy v porovnání s kontrolní skupinou. V ostatních sledovaných znacích nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl (**Tabulka 26, 27**).

Tabulka 26: Srovnání pozitivní a kontrolní skupiny na 1. laktaci

Parametr	Pozitivní zvířata		Kontrolní skupina		Průměrná diference (Kontr-Neg)	P-value*	Významnost rozdílů
	n	Průměr	n	Průměr			
Tuk	20	4,040	24	4,123	-0,083	0,6286	-
Bílkovina	20	3,452	24	3,436	0,016	0,8157	-
Laktóza	20	4,993	24	4,899	0,094	0,0260	+
Kg mléko	17	8543	19	8065	478	0,2391	-
Kg bílk	17	278,9	19	264,5	14,4	0,2515	-
Počet ins.	21	2,476	23	1,783	0,693	0,1576	-
Ins. interv.	21	95,1	23	88,9	6,2	0,4328	-
SP	21	165,7	23	137,2	28,5	0,2863	-

+ = P < 0,05 (statisticky významné), - = P > 0,05 (statisticky nevýznamné)

Tabulka 27: Srovnání pozitivní a kontrolní skupiny na 2. laktaci

Parametr	Pozitivní zvířata		Kontrolní skupina		Průměrná diference (Kontr-Neg)	P-value*	Významnost rozdílů
	n	Průměr	n	Průměr			
Tuk	23	3,916	22	3,970	-0,054	0,7483	-
Bílkovina	23	3,340	22	3,394	-0,054	0,4559	-
Laktóza	23	4,865	22	4,805	0,060	0,1068	-
Kg mléko	14	9001	12	9279	-278	0,6391	-
Kg bílk	14	285,6	12	289,3	-3,7	0,8543	-
Mezidobí	23	450,1	21	408,7	41,4	0,1689	-
Počet ins.	21	1,952	20	1,450	0,502	0,1018	-
Ins. interv.	21	93,9	20	109,3	-15,4	0,2154	-
SP	21	144,8	20	129,8	15,0	0,5013	-

+ = P < 0,05 (statisticky významné), - = P > 0,05 (statisticky nevýznamné)

Počet dojnic překračující limitní hodnotu SP (90 dní) je stejný u pozitivních i kontrolních dojnic (**Tabulka 28**), avšak obě skupiny se odlišují v součtu dnů SP nad limitní hodnotu. Zatímco u pozitivních dojnic je tento součet 1596 dnů u 1. laktací a 1155 dnů u 2.laktací, u kontrolních dojnic je to 1088 a 800 dnů.

Ekonomické ocenění ztrát při prodloužené servis periodě je zřehledněno v **Tabulce 29**. Vypočítaná průměrná ztráta na dojnici při pozitivním nálezu je vyšší oproti průměrné ztrátě při negativním nálezu jak na první, tak na druhé laktaci.

Tabulka 28: Rozdělení dojnic do jednotlivých intervalů dle délky servis periody

Interval		Do 40	41 - 75	76 - 90	91 - 120	Nad 121	Celkem
Dojnice							
pozitivní	Počet	0	3	8	9	22	42
	%	0	7,1	19,1	21,4	52,4	100,0
kontrolní	Počet	0	6	6	9	22	43
	%	0	14,0	14,0	20,9	51,2	100,0

Tabulka 24: Produkční ukazatele plemenic chovu C

Pořadí laktace	Skupina	Kg mléka			Tuk			Bílkovina			Laktóza		
		průměr	min.	max.	průměr	min.	max.	průměr	min.	max.	průměr	min.	max.
1	P	8543	6856	10757	4.04	3,35	4,95	3.45	3,15	3,77	4.99	4,80	5,24
	K	8065	5033	10355	4.12	2,89	5,18	3.44	3,02	3,87	4.90	4,70	5,12
2	P	9001	6676	11374	3.92	3,19	5,08	3.34	3,03	3,73	4.87	4,67	5,17
	K	9279	6825	11849	3.97	2,63	5,12	3.39	2,95	4,03	4.81	4,40	5,03

P – pozitivní, K - kontrolní

Tabulka 25: Reprodukční ukazatele pozitivních a kontrolních plemenic chovu C

Pořadí laktace	Skupina	Mezidobí			Inseminační interval			Servis perioda		
		průměr	min.	max.	průměr	min.	max.	průměr	min.	max.
1	P	-	-		95,1	26	139	165,7	74	462
	K	-	-		88,9	41	144	137,2	41	304
2	P	450,1	330	745	93,9	53	167	144,8	57	352
	K	408,7	309	581	109,3	51	239	129,8	51	316

P – pozitivní, K - kontrolní

Tabulka 29: Ekonomické ocenění ztrát při prodloužené servis periodě (chov C)

Pořadí laktace	Dojnic celkem	Průměrná délka SP	Pozitivní dojnice						Kontrolní dojnice					
			Pozitivních celkem	Pozitivní se SP nad 90 dní	Průměrná délka SP	Součet dnů SP nad průměrnou limitní hodnotu 90 dní	Ekonomické ocenění ztrát (Kč)*	Průměrná ztráta na pozitivní dojnici (Kč)	Kontrolní celkem	Kontrolní se SP nad 90 dní	Průměrná délka SP	Součet dnů SP nad průměrnou limitní hodnotu 90 dní	Ekonomické ocenění ztrát (Kč) *	Průměrná ztráta na negativní dojnici (Kč)
1	44	151	21	18	166	1596	79800 - 111720	3800 - 5320	23	16	137	1081	54050 - 75670	2350 - 3290
2	41	137	21	13	145	1155	57750 - 80850	2750 - 3850	20	15	130	800	40000 - 56000	2000 - 2800

* ekonomická ztráta prodloužením SP o den – 50 – 70 Kč

6. DISKUSE

Věkové kategorie

Chiodini (1996) tvrdí, že pouze část zvířat ze stáda stíženého paratuberkulózou je obvykle zjištěna jako infikovaná. Většina neinfikovaných zvířat tedy zřejmě musí být úspěšná v eliminování *MAP* z organismu.

K infekci jsou obecně nejvímavější mladá zvířata. Windsor a Whittington (2009) s využitím meta-analýzy několika významných studií prokázali, že jedinci starší šesti měsíců věku jsou vnímavější k *MAP* infekci v porovnání s dospělými zvířaty a současně jsou méně vnímaví k infekci při srovnání s telaty mladšími šesti měsíců věku. U velmi mladých jedinců je známá větší prostupnost střevní sliznice, což může usnadnit průnik *MAP* přes tuto bariéru (Sweeney, 1996). Windsor a Whittington (2009) přisuzují možný ochranný význam funkčnímu bachoru u dospělých zvířat, který by mohl ovlivňovat životaschopnost nebo virulenci *MAP*.

V nejmladší věkové kategorii (do 1,5 roku) chovu S bylo zjištěno sedm (14,3 %) kultivačně pozitivních zvířat. Slabá infekce *MAP* (sliznice jejuny) byla pozorována u telete starého pouze jeden měsíc. Další slabá infekce *MAP* byla potvrzena ve sliznici ileocaekální chlopně a ve výkalech u pětíměsíčního telete. Matky obou mláďat však byly kultivačně negativní. Předpokládáme tedy, že se zřejmě jednalo o jinou cestu přenosu než *in utero*. Současná kolonizace gastrointestinálního traktu a šíření *MAP* výkaly indikuje aktuální infekci, kterou je možné považovat u pětíměsíčního jedince za závažné zjištění.

U čtyřměsíčního telete bylo *MAP* izolováno (slabá infekce) z mízní uzliny jejuny. Vzhledem k tomu, že matka telete byla kultivačně pozitivní ve výkalech a v tkáních gastrointestinálního traktu, lze odhadovat, že se jednalo o infekci *in utero*.

Zbývající čtyři zvířata z věkové skupiny A, přibližně 1,5 roku stará, již měla prokázanou výraznější infekci *MAP* (++) a (+++) ve tkáních gastrointestinálního traktu. Dvě z těchto mladých zvířat byla potomky kultivačně pozitivních matek.

Ačkoliv v nejmladší věkové kategorii byl prokázán pouze malý počet kultivačně pozitivních jedinců, domníváme se, že počet infikovaných zvířat byl ve skutečnosti vyšší, avšak množství *MAP* u nich nedosahovalo detekčního limitu kultivační metody. Ta je podle našich současných výsledků 10^3 CFU/1 g vzorku (nepublikované údaje).

Kategorie zvířat do 1,5 roku věku nepodléhala v rámci ozdravovacího programu plošnému kultivačnímu vyšetření (Anonym, 2001). Jestliže u těchto zvířat dojde k vylučování *MAP* výkaly, mohou bez odhalení řadu měsíců zamořovat vnější prostředí *MAP*. Přítomnost pozitivních zvířat v této kategorii napovídá o silném infekčním tlaku ve sledovaném stádu.

K rozvoji vlastní infekce, spojené se zvýšením počtu kultivovatelného *MAP*, dochází s postupujícím věkem (Windsor a Whittington, 2009), o čemž svědčí také naše výsledky s vysokým počtem odhalených kultivačně pozitivních zvířat ve věkových kategoriích B a C. V kategorii B (1,6 - 3,0 roky) byl zjištěn nejvyšší počet pozitivních jedinců (21 zvířat; 43 %). Tato kategorie zahrnuje zvířata nastupující do produkce, kdy na organismus zvířete působí silné stresové faktory (otelení, začátek laktace a další).

Strmě stoupající produkce mléka po otelení představuje nejen u infikovaných, ale taktéž u zdravých, neinfikovaných dojníc velmi kritické období, v němž je organismus dojnice vystaven zvýšenému riziku vzniku negativní energetické bilance (Johnson-Ifearegbulundu a kol., 2000). Význam stresových faktorů jako je nutriční, laktační a jiné, popisují také Windsor a Whittington (2009). Kombinace těchto faktorů a imunologického stavu jednotlivce vytváří předpoklady výsledného stavu střetu *MAP* s organismem zvířete – infekce, regrese, rekonvalescence nebo rozvoj nemoci (Windsor a Whittington, 2009). Jmenované stresové vlivy mohou vést k oslabení buněčné imunity jedince spojené s vylučováním *MAP* výkaly (van Roermund a kol., 2007; Windsor a Whittington, 2009) a v konečném důsledku ke klinickým projevům paratuberkulózy (Ayele a kol., 2001; Hasonova a Pavlík, 2006).

Ve věkové kategorii C (3,1 - 8,0 let) byl rovněž zaznamenán vysoký počet pozitivních zvířat (18; 36,7 %). Naše studie tedy potvrzuje mínění některých autorů (Pavlík a kol., 1994; Kalis a kol., 1999), podle nichž nejvíce postihovaná jsou zvířata zapojená do produkce.

V kategorii D (nad 8,1 let) byl prokázán pouze nízký počet pozitivních jedinců (3; 6,1 %). Hlavní důvod lze spatřovat ve vyřazení většiny pozitivních zvířat již ve věkových kategoriích B a C. V této kategorii dokonce ještě bylo pět krav z původního importu z Dánska. Od těchto jedinců nebylo *MAP* izolováno. Lze předpokládat, že tato zvířata nebyla v mladém věku vystavena infekci a později měla vytvořenou věkovou rezistenci. Chiodini (1996) tvrdí, že dospělý skot se infikuje obtížně, což přisuzuje právě s věkem související odolnosti.

Rozložení infikovaných zvířat jak v chovu S (před i po radikální likvidaci), tak u zvířat v chovu C odpovídá informacím v jiných studiích (Chiodini a kol., 1984; Pavlík a kol., 1994; Kalis a kol., 1999), kdy většina pozitivních zvířat byla tři až pět let stará.

Nakažení zvířat ve stádě

MAP bylo izolováno od 33 dojnic (30 z kategorie B a C), z celkem 69 vyšetřených. Sedm dojnic (21,2 %) pocházelo od matek, u nichž bylo *MAP* také izolováno a 12 (36,4 %) dojnic mělo pozitivního potomka (jedna dojnice měla dva pozitivní potomky).

Z 36 *MAP*-negativních dojnic měly dvě (5,6 %) pozitivní matku a šest pozitivního potomka (16,7 %) (jedna dojnice měla dva pozitivní potomky). Tyto výsledky potvrzují jak vertikální (*in utero*, kolostrum, mléko), tak horizontální (fekálně-orální cesta infekce) způsob infikování zvířat v tomto stádu.

Šetřením byly v obou chovech zjištěny nedostatky ve výživě a ve způsobu odchovu telat (krmení směsného mléka bez tepelné úpravy, kontakt s dospělými jedinci, umístění venkovních boud pro telata u komunikace ke hnojišti). V chovu C byly vysokobřezí, ve výkalech pozitivní plemenice přesouvány do porodní sekce. Ochrana novorozených telat je považována za jeden z klíčových bodů v procesu ozdravování chovů (Windsor a Whittington, 2009), neboť právě mláďata v raném období života jsou považována za nejvímavější k infekci (Larsen a kol., 1975; Windsor a Whittington, 2009). Na základě těchto faktů a zjištěných nedostatků v péči o telata lze předpokládat, že k nakažení zvířat došlo právě v tomto kritickém období raného věku.

Podle seřazených dat narození infikovaných jedinců chovu S lze usoudit na zvýšený vliv nedostatků v odchovu telat v konkrétním období (měsíc). Např. v roce 2002 se z infikovaných zvířat tři narodila v lednu (19 %), dvě v červnu (13 %), dvě v srpnu (13 %), čtyři v září (25 %) a dvě v listopadu (13 %). V těchto měsících pravděpodobně došlo ke kontaktu (opakovanému) buď přímo s infikovaným jedincem, který vylučoval *MAP* výkaly nebo mlékem, a nebo nepřímo s vehikuly, které obsahovaly zárodky.

Vzhledem ke známé skutečnosti, že s věkem se odolnost k infekci zvyšuje (Larsen a kol., 1975), domníváme se, že většina pozitivních zvířat ve studovaných chovech byla nakažena v mladém věku.

Přítomnost *MAP* ve vzorcích výkalů

Ve vyšetřovaném stádu skotu chovu S byl prokázán nízký počet ve výkalech pozitivních zvířat. Kim a kol. (2004) tvrdí, že kultivace výkalů není efektivní metoda k detekci velmi slabých vylučovatelů a senzitivita může být pouze 50 % (McNab a kol., 1991b) nebo dokonce jen 33 % (Whitlock a kol., 2000). Giese a Ahrens (2000) stanovili ve své studii detekční limit pro kultivaci *MAP* na 100 CFU v 1 g vzorku. Whitlock a kol. (1996) popsali případ desetileté

krávy, u které bylo provedeno 13 kultivací výkalů s negativním výsledkem, přičemž kultivace orgánů potvrdila infekci v osmi z 27 odebraných tkání (Whitlock a kol., 1996). Buergelt a kol. (2004) provedli u býka s již rozvinutými klinickými příznaky paratuberkulózy v průběhu šesti měsíců trojí kultivační vyšetření výkalů, s negativním výsledkem. Navrhují, že zvíře buď nevylučovalo *MAP* výkaly, nebo výsledky vyšetření byly falešně negativní.

Výsledky kultivačního vyšetření výkalů závisí na stádiu infekce zvířete. Předpokládá se, že k výraznějšímu vylučování *MAP* výkaly (i mlékem) bude docházet s postupující infekcí, event. s rozvojem klinické formy onemocnění (Antognoli a kol., 2007). Nauta a van der Giessen (1998) ve své práci označují klinicky nemocná zvířata z epizootologického hlediska za nejrizikovější, vzhledem k vysokým koncentracím *MAP* vylučovaného výkaly, které může dosahovat 10^6 až 10^8 CFU/g (Whittington a Sergeant, 2001) a mlékem, v porovnání se subklinickými případy. Vylučování *MAP* výkaly v subklinickém stádiu nemoci zůstává různě dlouhé období pouze sporadické (de Lisle a kol., 1980). Naše práce byla zaměřena na odhalování subklinicky infikovaných zvířat. Subklinická forma je pro paratuberkulózu mnohem příznačnější (Whitlock a Buergelt, 1996; Grant, 2006), což jsme výsledky naší studie rovněž potvrdili. Pokud bychom u subklinických případů, odhalených v této práci, intenzitu infekce vyjádřili s pomocí intenzity izolace *MAP* z tkání, výsledkem je 19 silně, 10 středně a 20 slabě infikovaných zvířat. Z 19 zvířat silně infikovaných ve tkáních bylo u osmi izolováno *MAP* z výkalů. Na základě uvedených výsledků odhadujeme, že množství výkaly (či mlékem) vylučovaného *MAP* u některých jedinců zřejmě nedosahovalo detekčního limitu dané metody.

U žádného zvířete v naší studii nebyl prokázán současný pozitivní výsledek kultivačního vyšetření výkalů a negativní výsledek kultivačního vyšetření tkání. Lze předpokládat, že se jednalo o aktuální infekci s vylučováním původce paratuberkulózy, nikoliv o prostou pasáž, která byla popsána některými autory (McDonald a kol., 1999; Wu a kol., 2007).

Dalšími faktory, jež mohou ovlivnit úspěšnost kultivace vzorků výkalů jsou: zpracování vzorků – zejména mražení snižující životnost *MAP* (Richards a Thoen, 1977) a velmi významná je i použitá kultivační metoda a stupeň kontaminace vzorků (Stabel, 1997; McDonald a kol., 2005). Kultivační postupy se liší mezi jednotlivými zeměmi i mezi jednotlivými laboratoři (Kalis a kol., 1999). Kalis a kol. (1999) vzorky uchovávali při teplotě $+4^{\circ}\text{C}$ a tyto následně zpracovávali do 24 hodin od jejich převzetí v laboratoři. Vzorky výkalů v naší práci byly uchovány v mrazícím boxu při -20°C a zpracovávány postupně v průběhu 2 až 4 týdnů od odběru.

Kalis a kol. (1999) se zabývali rozdílem mezi působením nízko- a vysokorychlostní centrifugace. Z 59 zvířat, dříve zjištěných jako kultivačně pozitivní, byla při využití nízkorychlostní centrifugace pozitivita potvrzena u 43 a při využití vysokorychlostní centrifugace u 46 zvířat, přičemž rychlejší nárůst kolonií byl pozorován u vysokorychlostní centrifugace. V předkládané studii není odstředování součástí kultivačního protokolu při zpracování vzorků výkalů, neboť při dřívějším porovnávání výsledků mezi protokolem s centrifugací a bez ní, nebyly ve výsledcích zjištěny rozdíly (nepublikované údaje).

Délka dekontaminačního procesu může také ovlivňovat životaschopnost *MAP*. Dekontaminační proces, který jsme využívali u vzorků výkalů, probíhal 72 hod. V jiných studiích je navrhován kratší dekontaminační čas, kupříkladu Rajeev a kol. (2006) ve své studii dekontaminují vzorky tzv. *pres noc* (24 hod). V předešlých studiích však bylo zjištěno, že prodloužení dekontaminace nemá devitalizační účinek na *MAP* (Pavlik a kol., 2000a).

Rozhodující vliv může mít rovněž délka inkubace. Kalis a kol. (1999) navrhuji jako výhodnější prodloužit délku inkubace z běžně využívaných 12 týdnů (naše studie) na 16 týdnů, neboť ve své studii odhalili 43 z celkových 149 slabých vylučovatelů výkaly v období mezi 12. a 16. týdnem inkubace. Inkubaci o celkové délce 16 týdnů považuje Kalis a kol. (1999) za zvláště významnou právě k odhalení slabých vylučovatelů *MAP* a její využití v eliminační metodě ozdravování označují autoři za velmi prospěšné. Prodloužená inkubační doba je, na rozdíl od skotu, typicky využívána u vzorků výkalů pocházejících od domácích ovcí, s ohledem na obtížně kultivovatelné, pomaleji rostoucí kmeny *MAP* u ovcí (Juste a kol., 1991).

Kalis a kol. (1999) navrhuji, že by se kultivační techniky používané v různých zemích a laboratořích měly ujednotit.

Ke všem jmenovaným faktorům se v naší studii připojuje skutečnost, že ve výkalech pozitivní zvířata byla z chovu S odstraněna ihned po jejich odhalení, tedy ještě před zahájením porážky stáda.

Námi zjištěný vývoj prevalence infekce v chovu C se shoduje s výsledky, které publikoval Kalis a kol. (1999). Nejvýraznější pokles prevalence je obvykle pozorován po prvním testování, kdy jsou vyřazena pozitivní zvířata (Kalis a kol., 1999). V chovu C byl pozorován pokles prevalence z 11,1 % po prvním testování na 6,1 % a 3,6 %. Poté však došlo opět ke zvýšení prevalence (5,4 a 8,4 %). Zpětně jsme zjistili, že chovatel nevyřazoval pozitivní zvířata a tato v chovu různě dlouhou dobu zůstávala. Tuto skutečnost považujeme jako jednu z možných příčin zvýšené prevalence ve čtvrtém a pátém vyšetření. Stejně zkušenosti popsal také Kalis a kol. (1999), kdy nevyřazením tří vylučovatelek *MAP* došlo k vzrůstu prevalence infekce, což však autoři nepovažují za jedinou příčinu.

K vylučování *MAP* výkaly dochází nejčastěji u dospělých zvířat s klinickými příznaky nebo krátce před rozvojem klinických příznaků (Antognoli a kol., 2007). Ve stádech s vysokou prevalencí infekce začínají zvířata vylučovat původce paratuberkulózy v mladším věku (Weber, 2005). V naší studii bylo *MAP* prokázáno ve výkalech telete starého pouhých pět měsíců. Další možné vysvětlení pozitivní kultivace výkalů u velmi mladých zvířat, kromě zmíněné vysoké prevalence infekce, může být tzv. pasivní vylučování bez aktuální infekce tkání. U zmíněného telete v naší studii však bylo *MAP* izolováno současně ze sliznice ileocaekální chlopně, a proto nelze hovořit o prosté pasáži původce paratuberkulózy.

Vylučování *MAP* výkaly bylo potvrzeno u uměle infikovaných telat, po sedmi (McDonald a kol., 1999) a dokonce již po třech dnech od infikování (Wu a kol., 2007). V obou studiích přisuzují vylučování *MAP* v takto raném stádiu infekce zmíněnému pasivnímu vylučování. Může-li k tomuto jevu docházet také u přirozeně infikovaných telat v běžných farmových podmínkách, však zatím zůstává nezodpovězeno (van Roermund a kol., 2007). Van Roermund a kol. (2007) tvrdí, že z hlediska přenosu *MAP* mezi zvířaty vlastně není podstatné, zda zvíře vylučuje *MAP* aktivně či pasivně, neboť oba způsoby nakonec mohou vést k nakažení jiných zvířat.

Pokud dojde k přirozené infekci telete, jedná se s největší pravděpodobností o nižší infekční dávku oproti uměle vyvolané infekci (McDonald a kol., 1999; Antognoli a kol., 2007) a tedy k vylučování *MAP* výkaly dochází zřejmě později a s nižší intenzitou. S tímto tvrzením se shodují i výsledky naší studie.

Vylučování *MAP* výkaly mladých zvířat může být podhodnocené, neboť většina výzkumů je soustředěna pouze na dospělá zvířata. Časná diagnostika je navíc náročná, protože přirozeně infikovaná telata vylučují *MAP* intermitentně a v množství, které nemusí dosahovat detekčního limitu (Whitlock a Buergelt, 1996; Bolton a kol., 2005; Antognoli a kol., 2007). Nepravidelná izolace *MAP* od mladých jedinců může být způsobena stejnými faktory jako tomu je u zvířat dospělých. Van Roermund a kol. (2007) tvrdí, že telata krátce po infikování vylučují detekovatelné množství *MAP* výkaly, poté dochází na dlouhou dobu k poklesu množství původce ve výkalech až na nulové hodnoty a poté dochází opět k vzrůstu.

McDonald a kol. (1999) ve své práci popisují vylučování *MAP* výkaly u mladých jedinců ve věku 1 až 18 měsíců, avšak jako běžnější stanovili izolaci *MAP* od zvířat nad 16 měsíců. Kalis a kol. (1999) neprokázali vylučování *MAP* u jalovic mladších 11 měsíců, avšak ve věkové kategorii 13-14 měsíců již prokázali signifikantní výskyt pozitivních výsledků kultivačních vyšetření ($P \leq 0.01$). Bolton a kol. (2005) ve studii zahrnující 583 vzorků, izolovali *MAP*

z výkalů 2 % mladých zvířat a zjistili vztah mezi pozitivním infekčním statusem matek a pozitivními výsledky kultivací výkalů jejich potomků. Antognoli a kol. (2007) prokázali slabé vylučování *MAP* u jaloviček 8 měsíců starých.

V naší studii, která zahrnovala všechny věkové kategorie zvířat ve stádě, bylo slabé vylučování *MAP* výkaly potvrzeno u velmi mladého jedince. Lze tedy vyjádřit souhlas s publikacemi, v nichž je uvedeno, že časná detekce a odstranění infikovaných zvířat mladších dvou let by mohlo významnou měrou přispět kontrole paratuberkulózy redukcí kontaminace prostředí a šíření původce (McDonald a kol., 1999; Antognoli a kol., 2007).

V České republice se kulturačně vyšetřují výkaly zvířat starších 18 měsíců. Výše jmenované studie a také naše výsledky poukazují na riziko šíření *MAP* mladými zvířaty, které byť nedosahuje takových rozměrů jako u dospělých vylučovatelů, nemělo by být opomíjeno.

Diseminace *MAP* ve tkáních

O diseminaci *MAP* u subklinických případů paratuberkulózy není v porovnání s klinickými případy dosud mnoho známo (Antognoli a kol., 2008). Informace o tom, které tkáně a s jakou intenzitou mohou být kolonizovány *MAP*, jsou důležité nejen z hlediska prohloubení znalostí o patogenezi infekce, ale také z hlediska prevence kontaminace výrobků z živočišných surovin.

Ze 49 kulturačně pozitivních zvířat bylo u 38 (77,6 %) *MAP* izolováno pouze z tkání gastrointestinálního traktu, což potvrzuje primární lokalizaci této střevní infekce (Sweeney a kol., 1992a). U 11 (22,4 %) zvířat bylo *MAP* izolováno také z extraintestinálních tkání. Ve třech případech se jednalo o plicní mízní uzlinu, což považujeme za zajímavé s ohledem na publikované hypotetické úvahy o možném aerogenním přenosu této infekce (Corner a kol., 2004). Podle této hypotézy je skot vystavován infekci také inhalací živých zárodků *MAP* v aerosolu a prachových částicích. Infekční partikule mohou dorazit do plicních alveolů, zde mohou být pozřeny alveolárními makrofágy, pomocí kterých se dostanou do plicního lymfatického systému, odtud do krve a do celého organismu (Corner a kol., 2004). Detekce *MAP* v podčelistních mízních uzlinách zřejmě poukazuje na invazi *MAP* přes poškozenou sliznici dutiny ústní*. Pro potvrzení těchto hypotéz jsou však nezbytné další studie.

* prof. Pavlík, osobní sdělení, 2009

V nejmladší věkové kategorii bylo *MAP* izolováno pouze z tkání gastrointestinálního traktu. Za významný lze považovat pozitivní výsledek kultivačního vyšetření tkání (slabá izolace *MAP* ze sliznice jejunu) u telete mladšího jednoho měsíce.

Sweeney a kol. (2006) ve své studii založené na orální infekci neonatálních telat, navrhuji střevní sliznici za vstupní bránu *MAP* infekce s pozdějším rozšířením do mezenteriálních mízních uzlin. Wu a kol. (2007) po experimentální intratonsilární infekci u telat opakovaně izolovali *MAP* kultivačním vyšetřením pouze z ilea a souvisejících mízních uzlin, z čehož usuzují na preferenci této oblasti pro prvotní kolonizaci a udržování infekce původcem. V prvních dvou měsících po infekci byla kolonizace ilea a mízních uzlin podobná, po třech měsících byla kolonizace v mízních uzlinách výraznější.

Sweeney a kol. (2006) zmiňují význam velikosti infekční dávky. U telat, kterým byla aplikována nejsilnější infekční dávka, bylo *MAP* izolováno z většího počtu vzorků z gastrointestinálního traktu a ve větší intenzitě v porovnání s nízkou experimentální infekční dávkou.

Většina *MAP* pozitivních vzorků v naší studii pocházela z mízních uzlin koncového úseku jejunu (61,2 %) a ze sliznice ileocaekální chlopně (49,0 %). Podle některých autorů hraje tkáň ilea (spíše mízní uzlina než sliznice) důležitou roli jako rezervoár infekce (Coussens, 2004; Wu a kol., 2007). Z našich výsledků vyplývá, že tyto tkáně jsou velmi vhodné k potvrzení infekce, což je ve shodě s prací Anemori a kol. (2004).

Naopak extraintestinální tkáně nejsou vhodné k diagnostickým účelům, pouze v kombinaci s tkáněmi gastrointestinálního traktu.

Porovnání intenzity infekce tkání a vylučování *MAP* výkaly

Z 11 zvířat vylučujících *MAP* výkaly bylo pouze u jednoho zvířete zjištěno jak silné vylučování výkaly (+++), tak silná infekce tkání (+++). Naproti tomu u pěti zvířat slabě (+) a dvou středně silně (++) vylučujících *MAP* výkaly byla zjištěna silná infekce (+++) ve tkáních. Tři zbývající zvířata, slabě vylučující *MAP*, měla pouze slabou infekci tkání. Pozitivní vztah mezi intenzitou infekce tkání a intenzitou vylučování *MAP* výkaly, který by zde bylo možno očekávat, však nemůžeme, vzhledem k malému počtu vylučovatelů, zcela jistě potvrdit ani vyloučit. U zvířat slabě vylučujících *MAP* (+, ++) se silnou infekcí tkání by pravděpodobně brzy mohlo dojít k zintenzivnění vylučování původce, zvláště při působení stresových faktorů (Windsor a Whittington, 2009).

U 38 zvířat s pozitivní izolací *MAP* ze vzorků tkání, nebyl původce paratuberkulózy ve výkalech potvrzen. Podobné výsledky zjistil také Whitlock a kol. (1996), kdy u 22 jedinců, ve tkáních kultivačně pozitivních, bylo kultivační vyšetření výkalů negativní.

U jednoho slabého a dvou středně silných vylučovatelů *MAP* byl původce izolován kromě tkání gastrointestinálního traktu také v jiných tkáních (slezina, játra, děloha). Tato tři zvířata měla silně infikované tkáně.

Infekce plodu *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

V této studii byly zjištěny dva plody kultivačně pozitivní. Jeden plod, u něhož bylo *MAP* izolováno (+++) z jaterní tkáně, pocházel od krávy slabě infikované ve tkáni (pouze 1 CFU v ileocaecální mízní uzlině). Druhý plod (s masivním nárůstem *MAP* ze vzorku jater i střeva) pocházel od krávy silně infikované ve většině odebraných tkání a současně vylučující *MAP* výkaly. Na základě těchto výsledků nelze tvrdit, zda existuje souvislost mezi intenzitou infekce tkání a možností fetální infekce.

Kruip a kol. (2003) se domnívají, že k intrauterinnímu přenosu *MAP* dochází v pozdějších fázích březosti. Na základě dostupné chovatelské dokumentace jsme zjistili, že první z infikovaných plodů byl starý 6,5 a druhý 8 měsíců.

Lambeth a kol. (2004) vyšetřili šest plodů od pěti ovcí s klinickou paratuberkulózou a 63 plodů od 54 ovcí se subklinickou paratuberkulózou. Kultivačně pozitivních bylo pět plodů od ovcí s klinickou formou choroby a pouze jeden plod od subklinických matek. Některé publikované údaje odhadují, že 26 až 35 % plodů od klinicky postižených krav je infikováno *MAP*, zatímco pouze 10 % plodů od subklinicky infikovaných krav je infikováno *MAP* (Doyle, 1958; Seitz a kol., 1989; Whittington a Windsor, 2009). Tento údaj odpovídá našim výsledkům, kdy z 18 vyšetřených plodů od 16 subklinicky infikovaných krav byly kultivačně pozitivní dva (11 %). Z uvedeného je možno navrhnout, že s rozvojem infekce a nástupem klinických příznaků se zvyšuje pravděpodobnost fetální infekce.

Sweeney a kol. (1992a) ve své studii vyšetřili plody od 58 krav, které vylučovaly *MAP* výkaly a neměly klinické příznaky onemocnění a prokázali infekci pěti plodů pocházejících pouze od matek silně vylučujících *MAP* výkaly. V naší studii byly vyšetřeny tkáně sedmi plodů od 6 krav vylučujících *MAP* výkaly a pouze u jedné slabé vylučovatelky byla prokázána infekce plodu. Nemůžeme tedy potvrdit souvislost mezi vylučováním *MAP* výkaly, intenzitou vylučování a vyšší pravděpodobností infekce plodu.

Sweeney a kol. (1992a) navrhuje, že *MAP* je zřejmě častěji nalézáno ve fetálních ledvinách oproti jiným tkáním. Vzhledem k tomu, že ledviny plodu v naší studii nebyly odebrány, mohlo pravděpodobně dojít k podhodnocení skutečného počtu infikovaných plodů.

Ačkoliv jako hlavní cesta přenosu *MAP* je všeobecně považována fekálně-orální cesta, přenos *in utero* představuje další významnou možnost (Buergelt a kol., 2006), která by v kontrolních programech neměla být opomíjena.

Molekulární analýza

Metodou IS900 PCR byl potvrzen původce paratuberkulózy *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Metodou RFLP byl u všech izolátů identifikován kmen RFLP typu B-C1.

Kmen RFLP typu B-C1 se vyskytuje ve více než 98 % stád importovaných do České republiky po roce 1989 (Pavlik a kol., 1999a). Na základě výsledků analýzy lze usuzovat, že infekce byla do obou chovů zavlečena s importovanými zvířaty z Dánska, Německa a Francie. S ohledem na skutečnost, že se paratuberkulóza vyznačuje dlouhou inkubační dobou dosahující délky až 15 let, nepodařilo se po importu v 28 denní karanténě a ani později během dvouletého sledování importovaných zvířat na paratuberkulózu infikované jedince sérologicky diagnostikovat.

Vylučování *MAP* mlékem

Kultivační vyšetření mléka v této studii bylo negativní.

Výsledky některých studií poukazují na nízké počty kultivovatelného *MAP* v syrovém mléce (Giese a Ahrens, 2000; Lynch a kol., 2007). Detekční limit pro kultivaci z mléka byl navržen na 100 CFU/ml mléka (Giese a Ahrens, 2000). Sweeney a kol. (1992a) uvádí, že množství mlékem vylučovaného *MAP* u subklinických zvířat může být pouze 2 až 8 CFU/50 ml mléka.

Spolu s intermitentním vylučováním *MAP* mlékem (Corti a Stephan, 2002) mohou být tyto faktory vysvětlením negativních výsledků kultivačních vyšetření vzorků mléka v naší studii.

Další příčinou negativních výsledků kultivačního vyšetření mléka může být dekontaminace vzorků pomocí HPC a přidavek antibiotik do kultivačních médií, které jsou součástí většiny kultivačních protokolů a působí na *MAP* inhibičně (Gao a kol., 2005; Lynch a kol., 2007).

Vzhledem k tomu, že mléko nepředstavuje pro *MAP* přirozené prostředí, buňky *MAP* jsou v něm přítomny především v tzn. *L-formách*, bez buněčné stěny. Detekce těchto, v nepříznivých podmínkách vznikajících forem, je velmi limitovaná (Beran a kol., 2006).

Mechanismus, jakým se *MAP* dostává do mléka, není dosud zcela zřejmý (Slana a kol., 2008). Grant a kol. (2001) uvádí, že *MAP* se do mléka může dostat buď přímo z mléčné žlázy, a nebo nepřímo fekální kontaminací v průběhu dojení. Weber a kol. (2008) považují fekální kontaminaci z hlediska přítomnosti *MAP* v mléce za dominantní. Způsob odběru vzorků v naší studii možnost kontaminace mléka eliminoval.

U klinicky nemocných krav je větší pravděpodobnost vylučování *MAP* mlékem (Sweeney a kol., 1992a). V jedné studii je uvedena prevalence 45 % u klinické paratuberkulózy (Giese a Ahrens, 2000) oproti prevalenci 12 (Sweeney a kol., 1992a) a 22 % (Streeter a kol., 1995) u subklinické formy. Ovšem pro paratuberkulózu jsou typické především subklinické případy (van Schaik a kol., 2003), které ve stádě převažují, jak se naší studií skutečně potvrdilo. Grant (2006) počítá na jeden klinický případ paratuberkulózy v infikovaném stádu 4 - 8 subklinických případů, které pravidelně vylučují *MAP* výkaly, popř. mlékem. Lze se domnívat, že přítomnost subklinicky nemocných zvířat ve stádě neznámá pouze riziko šíření *MAP* mezi ostatní jedince, ale též riziko z hlediska bezpečnosti potravin. Bylo potvrzeno, že *MAP* přítomné v přirozeně infikovaném mléce přežívá pasterizaci, dokonce i při prodlouženém čase na 25s (Grant a kol., 2001, 2002, 2005).

Molekulární analýza vs. kultivace mléka

Kultivační vyšetření mléka pocházejícího od 13 vylučovatelek *MAP* výkaly bylo negativní. Naproti tomu metoda IS900 PCR určila devět pozitivních vzorků mléka. Negativní výsledek všech kultivačních vyšetření mléka v porovnání s vysokým zachytem pozitivních výsledků molekulární analýzou lze vysvětlit skutečností, že molekulární metody nerozlišují živé a mrtvé zárodky (Slana a kol., 2008). Na tomto místě je vhodné zmínit novější poznatky, podle kterých může v etiopatogenezi Crohnovy choroby u lidí hrát významnou roli nejen živý, ale dokonce devitalizovaný původce paratuberkulózy (Hruska a kol., 2005; Chamberlin a Naser, 2006)

Ovlivnění produkce a reprodukce dojnic

a. Mléčná produkce

Dobrý zdravotní stav patří mezi hlavní podmínky ekonomicky úspěšné výroby mléka (Kvapilík, 2006).

Předkládaná práce byla zaměřena na subklinické případy paratuberkulózy. Je známo, že klinická paratuberkulóza působí negativně na mléčnou produkci, avšak efekt subklinické *MAP* infekce není dosud zcela jednoznačně potvrzen (Gonda a kol., 2007). V některých studiích byla spojitost mezi subklinickou paratuberkulózou a nižší mléčnou produkcí, popř. sníženým obsahem mléčného tuku a bílkoviny popsána (Benedictus a kol., 1987; Wilson a kol., 1993, 1995; Sweeney a kol., 1994; Nordlund a kol., 1996; Lombard a kol., 2005; McKenna a kol., 2006; Beaudeau a kol., 2007; Tiwari a kol., 2008).

Nižší mléčnou produkci pozitivních dojníc v porovnání s kontrolními jsme v naší studii neprokázali. Podobně také v jiných studiích nebyla spojitost mezi subklinickou paratuberkulózou a mléčnou produkcí prokázána (Johnson a kol., 2001; Richardson a More, 2009; Hoogendam a kol., 2009). Hoogendam a kol. (2009) vyhodnotili nejen mléčnou produkci, ale také mléčný tuk a bílkovinu na úrovni jednotlivých laktací a signifikantní rozdíl mezi pozitivními a negativními zvířaty nezjistili. McNab a kol. (1991b) popsali signifikantně vyšší mléčnou produkci u LAM-ELISA pozitivních dojníc v porovnání s kontrolními. V chovu C jsme pozorovali statisticky nevýznamnou tendenci k vyšší mléčné produkci u pozitivních prvotetek (8543 kg) v porovnání s kontrolami (8065 kg), na druhé laktaci již měly pozitivní dojnice (9001 kg) nižší produkci mléka oproti kontrolním (9279 kg). Wilson a kol. (1993) dokonce popisují signifikantně vyšší produkci mléka u pozitivních prvotetek v porovnání s kontrolními dojnicemi, zatímco na druhé a vyšší laktaci byl pozorován opačný jev. Beaudeau a kol. (2007) na základě svých výsledků navrhuje, že stupeň redukce v produkci mléka se zvyšuje s pořadím laktace, což se shoduje s tvrzením, že produkční ztráty se zvyšují se stádiem infekce.

V naší práci měla skupina pozitivních dojníc chovu S statisticky významně nižší obsah tuku a bílkoviny na první laktaci a statisticky významně nižší obsah tuku na druhé laktaci oproti kontrolní skupině. Skupina pozitivních dojníc chovu C měla statisticky významně vyšší obsah laktózy na první laktaci v porovnání s kontrolní skupinou.

Přístupy ke zhodnocení mléčné užitkovosti se mezi jednotlivými studii liší (Hasonova a Pavlik, 2006). Jednou z popisovaných metod je srovnání užitkovosti pozitivních dojníc mezi poslední a předposlední laktací. Hlavní nedostatek tohoto postupu spatřujeme v samotné povaze paratuberkulózy (velmi dlouhá inkubační doba, převládající subklinická forma). Domníváme se, že v běžných podmínkách praxe je téměř nemožné určit počátek působení infekce na organismus zvířete. V případě chovu S byla navíc poslední laktace určena uměle likvidací stáda a lze vyslovit předpoklad, že u některých dojníc by se nemuselo jednat o poslední laktaci.

Beaudeau a kol. (1995) považují za důležité zohlednit v analýze načasování choroby, tzn. ve kterém stádiu laktace onemocnění propukne. Tvrdí, že nedostatkem mnoha studií, které se

zabývají vlivem určité nemoci na vyřazování zvířat, je právě skutečnost, že nezohledňují časovou závislost (tj. údaje před a po působení daného jevu, tj. nemoci, se budou lišit).

V naší studii jsme zvolili metodu srovnání údajů pozitivních a kontrolních zvířat na jejich jednotlivých laktacích, čímž jsme si vytvořili skupiny dat podle pořadí laktace 1, 2 a ≥ 3 , podobně jako Nielsen a Ersbøll (2006). Vezmeme-li v potaz, že k nakažení zvířete dochází ve většině případů v raném období života, pak z uvedeného vyplývá skutečnost, že infikovaný (handicapovaný) jedinec vstupuje do produkční části svého života. Stresové vlivy spojené s laktací jsou obecně známé (Windsor a Whittington, 2009). Zátěž organismu, jakou představuje zejména začátek první laktace, je značná nejen pro infikovaný, ale také pro zdravý organismus. Dalším důvodem volby tohoto postupu byla skutečnost, že v obou sledovaných chovech měla většina dojnic v době vyřazení dokončenou pouze první nebo druhou laktaci a jejich vzájemné srovnávání nepovažujeme za relevantní.

V chovu C byla většina dojnic vyřazena na první nebo druhé laktaci. Podobný jev zaznamenali také Buergelt a Duncan (1978), kteří jej dávali do spojitosti s vysokou mléčnou produkcí u těchto dojnic. Výsledkem bylo nucené vyřazení velkého počtu dojnic před dosažením vrcholu jejich produkčního potenciálu.

Ačkoliv jsme v naší práci nezaznamenali statisticky významné rozdíly v produkci mléka mezi pozitivními a kontrolními zvířaty, je nezbytné si uvědomit, že vyřazením dojnic po první či druhé laktaci je ztracena celá jejich budoucí produkce, což představuje největší ekonomické ztráty (Benedictus a kol., 1987; Groenendaal a Galligan, 1999). Výše ztráty budoucí produkce závisí na pořadí laktace, na měsíci laktace a na úrovni produkce (Weber a kol., 2008).

Lze odhadovat, že míra ovlivnění produkčních, ale též reprodukčních parametrů nebyla stejná u všech plemenic. Některá zvířata mají pravděpodobně lepší schopnost vypořádat se s *MAP* infekcí (Kudahl a kol., 2004). Velmi důležité z hlediska hodnocení významu paratuberkulózy je především stádium infekce (Benedictus a kol., 1987), senzitivita a specifita použitého diagnostického testu, měnící se podle stádia infekce (Dargatz a kol., 2001). Např. při porovnání ELISA metody a kultivace výkalů byly u stejných *MAP* infikovaných jedinců detekovány odlišné podskupiny zvířat (Collins a kol., 1991). McKenna a kol. (2006) tvrdí, že kultivační vyšetření výkalů může způsobit podhodnocení rozdílu mezi pozitivními a negativními zvířaty při srovnávání mléčné užitkovosti. Důvodem je poměrně nízká senzitivita této diagnostické metody, uvádí se zhruba 50 % (McNab a kol., 1991b), která vede k výskytu falešně negativních výsledků. Falešně negativní dojnice tedy v podstatě snižují průměrnou mléčnou produkci za laktaci u kontrolní skupiny, což ve výsledku vede k podhodnocení rozdílu mezi pozitivními

a negativními zvířaty (McKenna a kol., 2006). Skupina *MAP*-pozitivních a *MAP*-negativních zvířat chovu C byla vytvořena na základě výsledků kultivačního vyšetření výkalů.

Richardson a More (2009) tvrdí, že pokud je kontrolní skupina vytvořena ze zvířat z infikovaného chovu, celkový vliv nemoci nemůže být adekvátně zhodnocen, neboť nejde o kontrolní skupinu ve smyslu „kontrolní = zdravá“ zvířata, ale jedná se o potenciálně infikovaná zvířata.

Naše studie se vztahovala na dva jednotlivé, infikované chovy. Při posuzování jednotlivých chovů může být obtížné vysvětlit některé zjištěné výsledky (Richardson a More, 2009), kupř. signifikantně vyšší obsah laktózy u pozitivních dojnic v našem chovu C. Studii na jednotlivých chovech by bylo vhodné opakovat s využitím většího počtu stád (infikovaných a neinfikovaných), avšak srovnávání produkce mezi stády je komplikované z hlediska vysvětlení variabilit mezi stády (Richardson a More, 2009). Nordlund a kol. (1996) tuto variabilitu objasňují m.j. infekcí subpopulací zvířat s rozdílným genetickým produkčním potenciálem uvnitř stáda. Gonda a kol. (2007) tvrdí, že jsou-li vlivy infekce posuzovány u stád s odlišnými chovatelskými podmínkami, výsledky nemusí být relevantní, neboť chovatelské podmínky (péče o zdraví zvířat, welfare, přítomnost konkurenčního onemocnění aj.) mohou významně ovlivnit stanovení vlivu infekce na mléčnou produkci (Vanleeuwen a kol., 2002; Gonda a kol., 2007).

Za zajímavou lze považovat také spekulaci o tom, že plemeno Jersey, které v naší studii představuje chov S, zřejmě reaguje na infekci *MAP* odlišně v porovnání s jinými plemeny (Kudahl a kol., 2004). K rozvinutí této hypotézy by byla zapotřebí studie zaměřená na vliv *MAP* infekce na mléčnou produkci u různých plemen skotu.

Někteří autoři tvrdí, že k negativnímu ovlivnění mléčné produkce dochází pravděpodobně až v pozdějším období, což souvisí s patogenezí tohoto onemocnění, pro které je charakteristické dlouhé inkubační období (Wilson a kol., 1993; Johnson a kol., 2001). U dojnic s větším produkčním potenciálem lze, podle těchto autorů, očekávat vyšší riziko rozvoje onemocnění, avšak ve velmi časných stádiích infekce, může být mléčná produkce těchto zvířat dokonce paradoxně vyšší než je průměrná mléčná produkce (Johnson a kol., 2001). V pozdějším období, kdy dochází k progresi infekce, již lze očekávat pokles mléčné produkce. Benedictus a kol. (1987) prokázali u dojnic se subklinickou paratuberkulózou o 16 % nižší produkci mléka v poslední laktaci před vyřazením v porovnání s kontrolními zvířaty. Tiwari a kol. (2007) prokázali statisticky významný pokles mléčné produkce pouze u dojnic na čtvrté a vyšší laktaci. Lze předpokládat, že tyto dojnice již byly v pozdějším stádiu nemoci.

Johnson a kol. (2001) se domnívají, že je-li do výzkumu zahrnut pouze malý počet dojnic s vyšší laktací, vliv *MAP* na mléčnou produkci nemusí být prokázán. V jejich studii bylo 59 %

dojnic na první nebo druhé laktaci a signifikantní rozdíl mezi pozitivními a kontrolními dojnici nebyl zjištěn. V chovu S bylo 62,2 % dat (kg mléka za 305 dní) za první a druhou laktaci a v chovu C byly do hodnocení zařazeny pouze dojnice s první a druhou laktací. Užítkovost v naší studii však byla hodnocena na jednotlivých laktacích, nikoliv souhrnně za všechny laktace a rozdíly v mléčné produkci nebyly zjištěny ani u souboru dat za 3. a vyšší laktace.

Jednoznačný negativní vliv paratuberkulózy na mléčnou užítkovost se naší studií nepodařilo prokázat. Lze předpokládat, že organismus dojnice vyšlechtěné na vysokou mléčnou užítkovost je „zmobilizován“ k maximálnímu výkonu za všech situací. Dlouhodobě udržitelný tento stav samozřejmě není a tedy obvykle dochází k úhynu zvířete nebo nutnosti jeho utracení, avšak snížení mléčné užítkovosti se vůbec nemusí projevit *

b. Ovlivnění reprodukční výkonnosti dojnic

Signifikantní vliv subklinické paratuberkulózy na reprodukční ukazatele jsme v naší práci nepotvrdili, ačkoliv tyto byly ve většině případů u skupiny pozitivních plemenic v průměru horší v porovnání s kontrolními. Podobných výsledků dosáhli také McNab a kol. (1991b) v Kanadě a Chaffer a kol. (2002) v Izraeli.

Obdobně jako u mléčné produkce také u reprodukčních parametrů může hrát důležitou roli použitá diagnostická metoda. Johnson-Ifearulundu a kol. (2000) zjistili signifikantní prodloužení servis periody (28,0 dní; $p = 0,02$) u subklinicky infikovaných krav, které byly diagnostikovány ELISA testem, avšak při diagnostice pomocí kultivačního vyšetření výkalů nebo kombinace obou metod, nebyl vliv *MAP+* statusu prokázán. Objasnění vlivu použité diagnostické metody zůstává obtížné. Jednou z možností je, že ve stádech s vysokou prevalencí infekce, může být značné riziko výskytu falešně pozitivních výsledků kultivačních vyšetření výkalů, kdy v důsledku velké kontaminace prostředí může u některých zvířat docházet k prosté pasáži *MAP* střevem bez infekce (Johnson-Ifearulundu a kol., 2000; Nielsen a Ersbøll, 2006).

Jak bylo zmíněno výše, obecně dochází ke zhoršování reprodukčních ukazatelů a současně s tímto jevem se vyvíjí pohled na jejich optimální délku.

* prof. MVDr. Kursá, DrSc., osobní sdělení, 2007

V roce 1995 byla za optimální považována délka servis periody do 80 dní (Kvapilík, 1995), servis perioda nad 110 dní již byla považována za špatnou. V současné době je optimální nepřesáhnout hranici 110 dní*.

Nicméně platí, že každý další den následující po optimálním období od otelení, kdy dojnice stále nezabřezla, lze hodnotit jako ekonomicky nežádoucí (Rajala-Schultz a Gröhn, 1999b) a tento představuje rizikový faktor pro vyřazení plemence z chovu (Beaudeau a kol., 1995). Ekonomickou ztrátu způsobenou prodloužením servis periody (i mezidobí) o den nad optimální délku lze odhadnout přibližně na 50 až 70 Kč (Kvapilík, 2006), resp. v rozmezí 2 až 5 amerických dolarů (De Vries, 2006). Zjistili jsme, že u skupiny *MAP* pozitivních plemenic v obou chovech je ekonomická ztráta v důsledku prodloužené servis periody větší v porovnání s kontrolní skupinou.

Pro zhodnocení úrovně reprodukce ve stádě je vhodné provést rozdělení plemenic do jednotlivých intervalů servis periody. Podíl plemenic ve zvolených intervalech servis periody je dlouhodobě relativně stabilní. Podíl plemenic s hodnotou servis periody nad 120 dní se v období let 2003 až 2008 pohybuje mezi 42 až 43 % (Kvapilík a kol., 2009). V chovu S bylo 44,1 % pozitivních a 30,5 % kontrolních plemenic v intervalu nad 120 dní servis periody. V chovu C byl podíl jak pozitivních, tak kontrolních plemenic s délkou servis periody nad 120 dní vysoký (52,4 %, resp. 51,2 %), což může být vysvětleno vysokou užitkovostí v tomto chovu, ale také chybami v organizaci reprodukce.

Zhodnocení ozdravování sledovaných chovů

V obou chovech bylo při ozdravování postupováno dle Metodického návodu SVS ČR č. 6/2001 „Paratuberkulóza“ se zohledněním místních podmínek. Všechna vnímavá zvířata chovu S byla poražena a v chovu byla provedena příslušná opatření k odstranění *MAP* z prostředí. Po stanovené ochranné pozorovací době byla farma prohlášena za ozdravenou, naskladněna nová zvířata a znovu zahájena mléčná produkce. Celý proces lze zhodnotit jako relativně rychlý a úspěšný.

Vedle této definitivní varianty je eliminační metoda ozdravování časově velmi náročnou a frustrující záležitostí (Kreeger, 1991). V chovu C bylo za účelem urychlení procesu ozdravování prováděno plošné vyšetření výkalů čtyřikrát ročně. Můžeme odhadovat, že

* Ing. Staněk, osobní sdělení, 2009

zvýšením četnosti vyšetření výkalů bylo ročně odhaleno více zvířat vylučujících *MAP*. Některé výzkumy prokázaly, že mnohem výhodnější při ozdravování stád je využívat kombinace diagnostických testů v porovnání se samostatnou kultivací výkalů (Collins a Sockett, 1993), čímž se zkracuje celková doba potřebná k ozdravení chovu a výhodu lze současně spatřovat také v ekonomické stránce. Collins a Sockett (1993) odhadují délku ozdravování malého stáda skotu při využití samotného ELISA testu nebo samotné kultivace výkalů na 11 let. Kombinací obou těchto diagnostických metod se proces ozdravování může zkrátit o tři roky (Collins a Sockett, 1993).

Má-li být ozdravování chovu s pomocí eliminační metody úspěšné, je naprosto zásadní důsledné dodržování všech opatření (Pavlik a kol., 2000b). Chovatelé v nich ovšem často spatřují pouze nevýhody a v podmínkách praxe bývá nelehké obhájit časovou i finanční náročnost se současnými omezeními, z ozdravování plynoucími. Velice důležité při ozdravování chovů od paratuberkulózy je vyřazování vylučovatelů *MAP* výkaly ihned po jejich odhalení (Whitlock a Buergelt, 1996). Při vyhodnocování výsledků kultivačních vyšetření v chovu C byl zjištěn hrubý nedostatek v dodržování ozdravovacího postupu. Chovatel ponechával pozitivní dojnice v chovu a vyřazoval je obvykle až po objevení se klinických příznaků typických pro paratuberkulózu. V některých případech se jednalo dokonce o silné vylučovatelky *MAP*. Antognoli a kol. (2007) předpokládají, že vylučování *MAP* s postupující infekcí nabývá na intenzitě. Zvířata vylučující *MAP* se tedy různě dlouhou dobu pohybovala v chovu, což při systému volného ustájení zajišťuje šíření zárodků v dané produkční sekci a při přesunech zvířat i mimo ni, včetně možné kontaminace povrchů, napáječek apod. Toto období bylo v některých případech dokonce delší než 12 měsíců od zjištění kultivační positivity. Bylo potvrzeno, že zvířata vykazující klinické příznaky paratuberkulózy, vylučují *MAP* v množství 10^6 až 10^8 CFU/g výkalů (Whittington a Sergeant, 2001) a z epizootologického hlediska jsou považována za vysoce riziková (Nauta a van der Giessen, 1998). Za nejzávažnější pochybení chovatele lze považovat skutečnost, že dojnice – vylučovatelky *MAP* byly v období před porodem přesouvány do sekce, v níž probíhaly porody všech březích plemenic v chovu. Rossiter a Burhans (1996) zdůrazňují vysokou hygienickou úroveň porodních sekcí. Novorozená telata jsou považována za nejvůlnější k infekci (Larsen a kol., 1975) a je nezbytné zabránit jejich přímému i nepřímému kontaktu s infikovanými dospělými zvířaty (Pavlik a kol., 2000b). Whitlock a Buergelt (1996) tvrdí, že pokud se zvíře se zjevnými klinickými příznaky paratuberkulózy narodilo v daném chovu, lze předpokládat, že minimálně 25 dalších zvířat je infikováno.

Standardní postup ozdravování eliminační metodou (*test-and-cull*) popisuje Kalis a kol. (1999) jako kultivační vyšetření výkalů všech krav starších 24 měsíců s intervalem jednoho roku.

Pro zintenzivnění ozdravování navrhuji vyšetřování všech zvířat nad 12 měsíců s půlročním intervalem. Neodmyslitelnou součástí ozdravovacího postupu musí být zlepšení hygienických podmínek chovu. Kalis a kol. (1999) tvrdí, že efekt tohoto intenzivního postupu by se měl projevit za dva roky od jeho zahájení. Při ozdravování chovu C byla uskutečňována čtyři plošná vyšetření výkalů ročně u všech zvířat starších 18 měsíců. Zastávám názor, že zvolený velmi intenzivní postup v chovu C měl své opodstatnění ve zrychlení celého procesu. Od sedmého plošného vyšetření je patrná klesající tendence počtu pozitivních zvířat a současně také počtu silných vylučovatelů *MAP*. Dalším dílčím úspěchem bylo pět posledních vyšetření, která již neprokázala žádného silného vylučovatele *MAP*. Jedenácté a čtrnácté plošné vyšetření bylo dokonce negativní. Efekt námi použitého postupu se tedy projevil za necelé dva roky od jeho zahájení a lze vyslovit domněnku, že by se býval projevil dříve, pokud by chovatel dodržoval stanovená opatření a vyřazoval pozitivní zvířata.

Johnson a kol. (2001) se ve své studii zabývali otázkou, zda je ekonomicky prospěšné vyřazovat subklinicky infikované dojnice, které dosud neprojevují pokles mléčné produkce. Závěr, se kterým se ztotožňujeme, je, že vždy je třeba krátkodobé ekonomické ztráty spojené s předčasným vyřazováním těchto dojnic zvážit proti riziku, které subklinicky infikovaná zvířata pro chov představují. Nevyřazováním těchto jedinců dochází ke zvyšování stádové prevalence paratuberkulózy s následnými dlouhodobými ekonomickými ztrátami.

Při ozdravování chovu od paratuberkulózy je vždy nejdůležitější dodržovat všechna doporučená opatření, která mají eliminovat veškeré možné zdroje infekce (Kalis a kol., 1999).

7. SHRNUTÍ A ZÁVĚRY

Chov skotu je investičně a provozně velmi náročný úsek zemědělské činnosti.

Předkládaná studie dokumentuje závažnost ekonomických důsledků výskytu paratuberkulózy v chovech dojeného skotu v podmínkách České republiky.

V chovu S, který představuje rodinnou farmu zaměřenou na mléčnou produkci u dojnic plemene Jersey, byla diagnostikována paratuberkulóza po deseti letech budování stáda tvořeného importovanými krávy.

Následně odhalená vysoká promořenost chovu a nedostupnost chovného materiálu k obnově stáda z tuzemských zdrojů ovlivnila rozhodnutí změnit původní eliminační postup a řešit složitou nákazovou a ekonomickou situaci radikální metodou jako jediného východiska.

Celkem bylo poraženo 131 kusů zvířat, z nichž bylo 49 (37,4 %) kultivačně pozitivních v orgánech.

O výrazném promoření stáda svědčí přítomnost pozitivních zvířat ve všech věkových kategoriích. Nejvíce kultivačně pozitivních zvířat pocházelo z věkové kategorie B (1,6 - 3,0 let; 43 %) a C (3,1 - 8,0 let; 36,7 %). V těchto dvou věkových kategoriích byl současně prokázán nejčastější výskyt silné infekce tkání (+++).

V nejmladší věkové kategorii (A - do 1,5 roku) bylo zjištěno sedm (14,3 %) a v nejstarší (D - nad 8,1 let) tři pozitivní zvířata (6,1 %).

U 48 pozitivních zvířat (98,0 %) byl původce paratuberkulózy prokázán ve vzorcích z tenkého střeva, v nichž byl zároveň potvrzen nejčastější silný nárůst (+++) *MAP*.

Byla potvrzena diseminace *MAP* do extraintestinálních tkání.

Původce paratuberkulózy byl izolován z tkání dvou plodů.

Vylučování *MAP* výkaly bylo prokázáno u 22,5 % pozitivních zvířat. Nejvíce vylučovatelů pocházelo z věkové kategorie B a C. Velmi závažný je průkaz vylučování původce paratuberkulózy výkaly u telete 5 měsíců starého.

Pomocí metody IS900 PCR byl ve vyšetřovaných izolátech potvrzen původce paratuberkulózy. Metodou RFLP byl u všech izolátů identifikován kmen B-C1.

Chovatelská hodnota stáda S byla odhadnuta na 3 378 400,-Kč. Zvířata byla vykoupena „v mase“ za celkovou částku 86 750,-Kč.

Ztráty v důsledku likvidace stáda představují sumu 110 700,-Kč.

Náklady na pořízení nového stáda nákupem 50 vysokobřezích jalovic činily 1 mil Kč.

Na základě mléčných kvót, které byly chovu S přiděleny, byl učiněn odhad ztrát ušlého zisku za mléko na částku 1 968 000,-Kč za období 8 měsíců.

S radikální likvidací byly spojeny náklady na asanaci stájových prostor, pastevního areálu a na likvidaci krmiv, steliva a chlévské mrvy, celkem 1 172 603,-Kč.

Nižší produkci mléka u pozitivních dojnic v porovnání s kontrolními jsme v naší studii neprokázali.

V chovu S jsme zjistili statisticky významně nižší obsah tuku v mléce pozitivních dojnic na první a druhé laktaci a statisticky významně nižší obsah mléčné bílkoviny u pozitivních dojnic na první laktaci. V chovu C jsme zjistili pouze statisticky významně vyšší obsah laktózy u pozitivních dojnic na první laktaci v porovnání s kontrolními.

Vliv subklinické paratuberkulózy na reprodukční ukazatele jsme nepotvrdili, ačkoliv tyto byly ve většině případů u skupiny pozitivních plemenic v průměru horší v porovnání s kontrolními.

Chov C byl ozdravován eliminační metodou založenou na pravidelných plošných kultivačních vyšetření výkalů. Eliminační metoda je ekonomicky náročná a dlouhodobá záležitost. V chovu C přinesla v období 2004 až 2007 dílčí výsledky, spočívající ve snížení prevalence vylučovatelů *MAP* výkaly a současně ve snížení infekční zátěže prostředí. Hlavním nedostatkem eliminační metody zůstává diagnostika. Při využití kultivačních metod prokážeme pozitivní zvíře obvykle s odstupem dvou až tří měsíců, které vyžaduje původce paratuberkulózy k růstu na kultivačních půdách. Tzn., že jedinec vylučující původce výkaly je odhalen s dvou až tříměsíčním „zpožděním“, během kterého šíří zárodky do prostředí stájí či pastvin.

Z předložené analýzy dvou paratuberkulózu stížených chovů vyplývá aktuální potřeba rigorózních přístupů, a to jak k řešení diagnostiky této nákazy v našich chovech, tak k objasnění otázek souvisejících se státní podporou systematického programu tlumení nákazy v České republice. Účast pojišťoven při hrazení nákladů spojených s paratuberkulózu se v současné době omezuje na částečnou náhradu vyřazovaných infikovaných zvířat. Na úhradě vyřazovaných potomků infikovaných matek (nejčastěji jalovičky či vysokobřezí jalovice) se však žádné z pojišťoven v České republice nepodílí. Navíc při ozdravování chovu nastávají situace, kdy pojišťovna neobnoví smlouvu s chovatelem nebo ze smlouvy vyloučí náhradu všech zvířat při radikální likvidaci. V těchto případech jsou veškeré náklady hrazeny chovatelem, což je ve většině případů situace neslučitelná s další existencí chovu.

V obou chovech bylo uskutečněno vyšetření mléka. V chovu S se jednalo o soubor vzorků mléka od 69 dojnic, odebraný jednorázově při radikální likvidaci. V chovu C bylo mléko odebíráno v prvním období jako individuální čtvrtěové vzorky od šesti dojnic (vylučovatelek *MAP* výkaly) a bazénové vzorky v průběhu tří dnů. V dalším období pak jako čtyřnásobný odběr směsných vzorků mléka od 16 dojnic (vylučovatelek *MAP* výkaly) spolu s bazénovými vzorky mléka.

Vzorky mléka z obou chovů byly na přítomnost původce paratuberkulózy kultivačně negativní.

Pomocí molekulárních metod byla přítomnost buněk *MAP* v syrovém mléce prokázána.

Ve spojitosti s paratuberkulózou bývá velmi často skloňováno onemocnění lidí označované jako Crohnova choroba, která ovšem nemá jasnou etiologii a příčinná souvislost mezi těmito chorobami exaktně prokázána není (Groenendaal a Zagmutt, 2008). Přesto zůstává možné spolupůsobení *MAP* na rozvoj tohoto onemocnění stále předmětem řady výzkumů (Groenendaal a Zagmutt, 2008).

Podle současných poznatků z oblasti humánní medicíny se začínají prosazovat názory o autoimunitním charakteru Crohnovy choroby a etiopatogenetickém významu nejen živého původce, ale také mrtvých buněk *MAP* v potravinách (zejména mléce a mléčných výrobcích) (Chamberlin a Naser, 2006). Průkaz živých kmenů *MAP* v tržním pasterizovaném mléce a dokonce i v dětské výživě je varující (Hruska a kol., 2005). Již dnes se objevují požadavky mlékáren, exportujících své produkty do zahraničí, na vykupované mléko bez původce paratuberkulózy.

Chovatelé dojeného skotu v současné době odevzdávají společně s žádostí o přidělení mléčných kvót také potvrzení o tom, že jejich chov je prostý paratuberkulózy.

Uvedené okolnosti pravděpodobně způsobí další zvýšení ekonomických ztrát v infikovaných chovech.

Zcela nepopiratelný vliv na ekonomiku chovu dojeného skotu má koncový článek řetězce, tedy spotřebitel a konzumace mléka jako taková.

Groenendaal a Zagmutt (2008) se ve své práci zabývají hypotetickými scénáři ovlivnění konzumace mléka a mléčných výrobků za situace, kdy by se potvrdila příčinná souvislost mezi *MAP* a Crohnovou chorobou. Podle nejhoršího scénáře může dokonce dojít k výraznému poklesu

mléčné poptávky s následnými ekonomickými ztrátami, které se logicky nejcitelněji dotknou mléčných farem s pozitivními testy na *MAP* (Groenendaal a Zagmutt, 2008). Výše ekonomických ztrát by poté závisela na mínění zákazníka-konzumenta. Pokud by vnímal riziko nakažení z mléka jako vysoké a strategie k minimalizaci tohoto rizika jako málo účinné či neúčinné, pak by mohly být škody velmi závažné. Připočteme-li k uvedenému navíc stále silněji působící vliv médií na populaci, pak získáváme velmi alarmující výsledek.

Postskriptum

Na úplný závěr si dovolím krátkou úvahu k celé problematice.

V oblasti diagnostiky a zdolávání paratuberkulózy došlo v posledním období k velmi zásadním změnám. K těm pozitivním patří bezesporu významný rozvoj moderních diagnostických metod a relativně vysoká informovanost nejen veterinárních lékařů, ale také chovatelů, v porovnání s minulým obdobím. Vedle těchto příznivých zpráv, došlo také k některým změnám, mluvíme-li o situaci v České republice, které lze označit spíše krokem zpět ve vývoji. Do roku 2008 byl využíván Metodický návod ke zdolávání paratuberkulózy č.6/2001. V této práci jsem nastínila, že šlo, jak z názvu vyplývá skutečně o návod, jak postupovat při řešení výskytu tohoto onemocnění v chovu a tedy pomůcku pro veterinární lékaře, inspektory KVS i samotné chovatele. Podle nově zavedeného Metodického návodu č. 5/2008 se v diagnostice paratuberkulózy bude využívat především ELISA metoda a důležitým hlediskem bude, zda se v chovu bude onemocnění vyskytovat ve své klinické podobě, která ovšem není pro paratuberkulózu typická. Podstatnou skutečností také je, že hlavní zodpovědnost ponесou v porovnání s dřívější SVS a příslušnými inspektoráty, sami chovatelé a chovatelské svazy.

V případě tak komplikovaného onemocnění, jakým paratuberkulóza bezpochyby je, je třeba hledat komplexní řešení a systematické přístupy. Ozdravování pouze několika chovů za komplexní označit nelze. Takto byl ovšem chápán jmenovaný starší metodický návod, kdy pouze chovy, které ohlásily výskyt paratuberkulózy, postupovaly dle tohoto návodu a dodržovaly příkazy a omezení stanovené příslušnými inspektoráty. Nastávaly však situace, kdy majitel chovu, v němž sice paratuberkulóza přítomna byla, ale který v podstatě hlášený nebyl, bez skrupulí prodal do jiného chovu jalovice či krávy, které byly záhy zjištěné jako pozitivní při diagnostice paratuberkulózy. Tedy daný metodický návod se nesetkával s nejlepším ohlase, neboť chovatelé viděli, že hlášení paratuberkulózy ač povinné, neprobíhá tak, jak by mělo a dochází k restrikcím pouze některých svědomitých chovatelů. V podstatě tak, jak vyjádřil, byť v naprosto odlišných podmínkách Johnson-Ifearulundu and Kannene (1997): „Producent, který se otevřeně pokouší o kontrolu paratuberkulózy na své farmě a nešíří ji na jiné farmy, nese nespravedlivě zátěž způsobenou současnými omezeními ve srovnání s podniky, kde se vědomě či nevědomě paratuberkulóza „nediagnostikuje“.

Pro srovnání použiji jiné onemocnění skotu a to infekční bovinní rhinotracheitidu (IBR), u níž je od počátku roku 2006 zaveden povinný ozdravovací program, který nás řadí mezi vyspělé země, které ozdravily či ozdravují své chovy. Zahájením tohoto programu si ČR má udržet integritu v rámci evropského zemědělství a tedy, a to je hlavní - obchodovatelnost a konkurenceschopnost. Dříve využívané ozdravovací postupy byly dobrovolné, z čehož, jak uvádí informační brožura na internetových stránkách SVS, vyplynula jejich malá efektivita. Zavedený povinný program ozdravení chovů od IBR představoval tedy jediné vhodné řešení a znamená dlouhodobý proces.

*Vrátíme-li se zpět k **paratuberkulóze**, pak je třeba upozornit, že otázka obchodovatelnosti je stejná jako u IBR. Pokud okolní země budou v ozdravování plynule pokračovat, staneme se pro ně z hlediska obchodu nevhodnými partnery. S novým metodickým návodem a především novým přístupem SVS ČR došlo k jakémusi „uvolnění stavu“. Chovy, které již několik let ozdravovaly (ku příkladu chov C) a v nichž došlo k eliminaci vylučovatelek a zlepšení epizootologické situace, ustaly v zavedeném systému pravidelného vyšetřování. Přešly k systému vyřazování klinických případů. Zjišťování subklinických krav vylučujících původce výkaly tak bylo v chovu C po čtyřech letech, čítajících celkem 14 odběrů, zastaveno. Podíváme-li se na tabulku a graf zřehledňující výsledky plošných kultivačních vyšetření v chovu C, vidíme klesající tendenci pozitivních výsledků – prvních šest vyšetření přineslo*

velký počet odhalených vyučovateli MAP, poté došlo k postupnému snižování jejich výskytu a objevily se dokonce dva zcela negativní náběry. Tyto však nenásledují ihned po sobě, jak vyžadoval metodický návod a tedy nebylo možné prohlásit chov za ozdravený. Právě náběr č. 14. byl negativní, takže různé ukončení kultivačních vyšetření výkalů lze označit za poněkud předčasné a tvrdím si říci i krátkozraké, neboť chov mohl do budoucna získat s negativním statutem výhody právě z hlediska obchodu a konkurenceschopnosti.

8. LITERATURA

- Abbas B., Riemann H.P., Hird D.W. (1983):** Diagnosis of Johne's disease (paratuberculosis) in Northern California cattle and a note on its economic significance. *California Veterinarian*, 8, 20-24.
- Amemori T., Matlova L., Fischer O.A., Ayele W.Y., Machackova M., Gopfert E., Pavlik I. (2004):** Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the gastrointestinal tract of shedding cows and its application to laparoscopic biopsy. *Veterinarni Medicina*, 2004, 49, 225-236.
<http://www.vri.cz/docs/vetmed/49-7-225.pdf>
- Anonym (2001):** Metodický návod č. 6/2001 k prevenci, diagnostice a zdolávání paratuberkulózy. Státní veterinární správa České republiky, 5 ss.
- Antognoli M.C., Hirst H.L., Garry F.B., Salman M.D. (2007):** Immune response to and faecal shedding of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in young dairy calves, and the association between test results in the calves and the infection status of their dams. *Zoonoses and Public Health*, 54, 152-159.
- Antognoli M.C., Garry F.B., Hirst H.L., Lombard J.E., Dennis M.M., Gould D.H., Salman M.D. (2008):** Characterization of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* disseminated infection in dairy cattle and its association with antemortem test results. *Veterinary Microbiology*, 127, 300-308.
- Arbel R., Bigun Y., Ezra E., Sturman H., Hojman D. (2001):** The effect of extended calving intervals in high lactating cows on milk production and profitability. *Journal of Dairy Science*, 84, 600-608.
- Ayele W.Y., Bartos M., Svastova P., Pavlik I. (2004):** Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in organs of naturally infected bull-calves and breeding bulls. *Veterinary Microbiology*, 103, 209-217.
- Ayele W.Y., Machackova M., Pavlik I. (2001):** The transmission and impact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants. *Veterinarni Medicina*, 46, 205-224. <http://www.vri.cz/docs/vetmed/46-8-205.pdf>
- Beaudeau F., Belliard M., Joly A., Seegers H. (2007):** Reduction in milk yield associated with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) infection in dairy cows. *Veterinary Research*, 38, 625-634.

- Beaudeau F., Ducrocq V., Fourichon C., Seegers H. (1995):** Effect of disease on length of productive life of French Holstein dairy cows assessed by survival analysis. *Journal of Dairy Science*, 78, 103-117.
- Benedictus G., Dijkhuizen A.A., Stelwagen J. (1987):** Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle. *Veterinary Record*, 121, 142-146.
- Bennett R. (2003):** The 'Direct costs' of livestock disease: The development of a system of models for the analysis of 30 endemic livestock diseases in Great Britain. *Journal of Agricultural Economics*, 54, 55-71.
- Beran V., Havelkova M., Kaustova J., Dvorska L., Pavlik I. (2006):** Cell wall deficient forms of mycobacteria: a review. *Veterinarni Medicina*, 51, 365-389.
- Bielanski A., Algire J., Randall G.C.B., Surujballi O. (2006):** Risk of transmission of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* by embryo transfer of in vivo and in vitro fertilized bovine embryos. *Theriogenology*, 66, 260-266.
- Bolton M.W., Grooms D.L., Kaneene J.B. (2005):** Fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in calves: Implications for disease control and management. In: Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Copenhagen, Denmark, 14-17th August, 2005, ISBN 0-9633043-6-4.
- Buergelt C.D., Duncan J.R. (1978):** Age and milk production data of cattle culled from a dairy herd with paratuberculosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 173, 478-480.
- Buergelt C.D., Donovan G.A., Williams J.E. (2004):** Identification of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* by Polymerase Chain Reaction in blood and semen of a bull with clinical paratuberculosis. *The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 2, 130-134.
- Buergelt C.D., Williams E., Monif G.R.G., Pinedo P., Decker J.H. (2006):** Nested Polymerase Chain Reaction and prenatal detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (Map) in bovine allantoic fluid and fetuses. *The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 4, 232-238.
- Brady C., O'Grady D., O'Meara F., Bassett H. (2008):** Relationships between clinical signs, pathological changes and tissue distribution of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in 21 cows from herds affected by Johne's disease. *The Veterinary Record*, 162, 147-152.

- Cetinkaya B., Erdogan H.M., Morgan K.L. (1997):** Relationships between the presence of Johne's disease and farm and management factors in dairy cattle in England. *Preventive Veterinary Medicine*, 32, 253-266.
- Cocito C., Gilot P., Coene M., de Kesel M., Poupart P., Vannuffel P. (1994):** Paratuberculosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 7, 328-345.
- Collins D.M., Gabric D.M., deLisle G.W. (1990):** Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, 28, 1591-1596.
- Collins M.T., Nordlund K. (1991):** Milk production levels in cows ELISA positive for serum antibodies to *M. paratuberculosis*. In: Proceedings of the 3rd International Colloquium on Paratuberculosis, Orlando, Florida, USA, 28th September to 2nd October, 1991, ISBN 0-9633043-0-5, 401-409.
- Collins M.T., Sockett D.C. (1993):** Accuracy and economics of the USDA-licensed enzyme-linked immunosorbent assay for bovine paratuberculosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 203, 1456-1463.
- Collins M.T., Sockett D.C., Goodger W.J., Conrad T.A., Thomas C.B., Carr D.J. (1994):** Herd prevalence and geographic distribution of, and risk factors for bovine paratuberculosis in Wisconsin. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 204, 636-641.
- Corner L.A.L., Pfeiffer D.U., Abbott K.A. (2004):** The respiratory tract as a hypothetical route of infection of cattle with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Australian Veterinary Journal*, 82, 170-173.
- Corti S., Stephan R. (2002):** Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* specific IS900 insertion sequences in bulk-tank milk samples obtained from different regions throughout Switzerland. *BMC Microbiology*, 2, 1-7.
- Coussens P.M. (2004):** Model for immune responses to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* specific in cattle. *Infection and Immunity*, 72, 3089-3096.
- Chaffer M., Grinberg K., Ezra E., Elad D. (2002):** The effect of sub-clinical Johne's disease on milk production, fertility and milk quality in Israel. In: Proceedings of the 7th International Colloquium on Paratuberculosis, Bilbao, Spain, 11th to 14th June, 2002, ISBN 0-9633043-5-6 (pbk.: alk. paper), 351-357.
- Chamberlin W.M., Naser S.A. (2006):** Integrating theories of the etiology of Crohn's disease. On the etiology of Crohn's disease: questioning the hypotheses. *Medical Science Monitor*, 12, 27-33.

- Chi J., Van Leeuwen J.A., Weersink A., Keefe G.P. (2002):** Direct production losses and treatment costs from bovine viral diarrhoea virus, bovine leukosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, and *Neospora caninum*. *Preventive Veterinary Medicine*, 55, 137–153.
- Chiodini R.J. (1996):** Immunology: resistance to paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 12, 313-343.
- Chiodini R.J., Van Kruiningen H.J. (1986):** The prevalence of paratuberculosis in culled New England cattle. *Cornell Veterinarian*, 76, 91-104.
- Chiodini R.J., Van Kruiningen H.J., Merkal R.S. (1984):** Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): The current status and future prospects. *Cornell Veterinarian*, 74, 218-262.
- Dargatz D.A., Byrum B.A., Barber L.K., Sweeney R.W., Whitlock R.H. Shulaw W.P., Jacobson R.H., Stabel J.R. (2001):** Evaluation of a commercial ELISA for diagnosis of paratuberculosis in cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 218, 1163-1166.
- de Lisle G.W., Milestone B.A. (1989):** The economic impact of Johne's disease in New Zealand. In: *Johne's Disease, Current Trends in Research Diagnosis and Management*, Victoria, Australia, CSIRO, 41-45.
- de Lisle G.W., Samagh B.S., Duncan J.R. (1980):** Bovine paratuberculosis II. A comparison of fecal culture and the antibody response. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 44, 183-191.
- De Vries A. (2006):** Economic value of pregnancy in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 80, 3876-3885.
- Dijkhuizen A.A., Stelwagen J., Renkema J.A. (1985):** Economic aspects of reproductive failure in dairy-cattle. 1. Financial loss at farm level. *Preventive Veterinary Medicine*, 3, 251–263.
- Dorshorst N.C., Collins M.T., Lombard J.E. (2006):** Decision analysis model for paratuberculosis control in commercial dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 75, 92-122.
- Dotta U., Guglielmino R., Cagnasso A., Angelo A.D., Prato S., Bosso M. (1999):** Effects of subclinical bovine paratuberculosis on in-vitro polymorphonuclear neutrophil migration. *Journal of Comparative Pathology*, 121, 399–403.
- Doyle T.M. (1956):** Johne's disease. *Veterinary Record*, 68, 869-886.
- Doyle T.M. (1958):** Foetal infection in Johne's disease. *Veterinary Record*, 70, 238.

- Dufour B., Pouillot R., Durand B. (2004):** A cost/benefit study of paratuberculosis certification in French cattle herds. *Veterinary Research*, 35, 69–81.
- Eppleston J., Whittington R.Y. (2001):** Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from the semen of rams with clinical Johne's disease. *Australian Veterinary Journal*, 79, 776-771.
- Gao A., Odumeru J., Raymond M., Mutharia L. (2005):** Development of improved method for isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from bulk tank milk : effect of age of milk, centrifugation, and decontamination. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 69, 81-87.
- Gay J.M., Sherman D.M. (1992):** Factors in the epidemiology and control of ruminant paratuberculosis. *Veterinary Medicine (USA)*, 87, 1133-1139.
- Giese S.B., Ahrens P. (2000):** Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from clinically affected cows by PCR and culture. *Veterinary Microbiology*, 77, 291-297.
- Gonda M.G., Chang Y.M., Shook G.E., Collins M.T., Kirkpatrick B.W. (2006):** Genetic variation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in US Holsteins. *Journal of Dairy Science*, 89, 1804-1812.
- Gonda M.G., Chang Y.M., Shook G.E., Collins M.T., Kirkpatrick B.W. (2007):** Effect of *Mycobacterium paratuberculosis* infection on production, reproduction, and health traits in US Holsteins. *Preventive Veterinary Medicine*, 80, 103-119.
- Goodger W.J., Collins M.T., Nordlund K.V., Eisele C., Pelletier J., Thomas C.B., Sockett D.C. (1996):** Epidemiologic study of on-farm management practices associated with prevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* infections in dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 208, 1877-1881.
- Grant I.R. (2006) :** *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in foods : current evidence and potential consequences. *International Journal of Dairy Technology*, 59, 112-117.
- Grant I.R., Rowe M.T., Dundee L., Hitchings E. (2001):** *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* : its incidence, heat resistance and detection in milk and dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 54, 2-13.
- Grant I.R., Hitchings E.I., McCartney A., Ferguson F., Rowe M.T. (2002) :** Effect of commercial-scale high temperature, short-time pasteurization on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in naturally infected cows'milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 602-607.

- Grant I.R., Williams A.G., Rowe M.T., Muir D.D. (2005)** : Efficacy of various pasteurization time-temperature conditions in combination with homogenization on inactivation of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 2853-2861.
- Groenendaal H. (2005)**: Control programs for Johne's disease. *Advances in Dairy Technology*, 17, 81–94.
- Groenendaal H., Galligan D.T. (1999)**: Economic consequences of Johne's disease control programs. Center of Animal Health and Productivity, School of Veterinary Medicine, University of Pennsylvania. Study Report. 53 pp.
- Groenendaal H., Zagmutt F.J. (2008)** : Scenario analysis of changes in consumption of dairy products caused by a hypothetical causal link between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Journal of Dairy Science*, 91, 3245-3258.
- Gröhn Y.T., Rajala-Schultz P.J. (2000)** : Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 605-614.
- Harris N.B., Barletta R.G. (2001)**: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3), 489-512.
- Hasonova L., Pavlík I. (2006)**: Economic impact of paratuberculosis in dairy cattle herds: a review. *Veterinarni medicina*, 51 (5), 193-211.
<http://www.vri.cz/docs/vetmed/51-5-193.pdf>
- Hasoňová L., Kříž P., Pavlík I. (2008)**: Původce paratuberkulózy – vlastnosti, jež komplikují ozdravování chovů. *Náš chov*, LXVIII (7), 22-25.
- Hendrich S. H., Keton D., Leslie K.E., Lissemore K.D., Archambault M., Duffield T.F. (2005)**: Effect of paratuberculosis on culling, milk production, and milk quality in dairy herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 227, 1302-1308.
- Hermon-Taylor J., Bull T.J., Sheridan J.N., Cheng J., Stellakis M.L., Sumar N. (2000)**: Causation of Crohn's disease by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Canadian Journal of Gastroenterology*, 14, 521-539.
- Herthnek D., Englund S., Willemsen P.T.J., Bölske G. (2006)**: Sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine semen by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 1095-1102.
- Hill J.F. (1989)**: Vaccination against Johne's disease. In: Milner A.R., Wood P.R. (Eds.), *Johne's disease: Current trends in research, diagnosis and management*. CSIRO Publications, East Melbourne, Australia, 167 pp.

- Hoogendam K., Richardson E., Mee J.F. (2009):** Paratuberculosis sero-status and milk production, SCC and calving interval in Irish dairy herds. *Irish Veterinary Journal*, 62, 265-271.
- Hutchinson L.J. (1988):** Review of estimated economic impact and control of Johne's disease in cattle. *Agri-Practice*, 9, 7-8.
- Hutchinson L.J. (1996):** Economic impact of paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 12, 373–381.
- Hulten K., El-Zimaity H.M.T., Karttunen T.J., Almashhrawi A., Schwarz M.R., Graham D.Y., El-Zaatari F.A.K. (2001):** Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Crohn's diseased tissues by in situ hybridization. *The American Journal of Gastroenterology*, 96, 1529-1535.
- Hruska K., Bartos M., Kralik P., Pavlik I. (2005):** *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in powdered infant milk paratuberculosis in cattle – the public health problem to be solved. *Veterinarni Medicina*, 50, 327-335. <http://www.vri.cz/docs/vetmed/50-8-327.pdf>
- Johnson-Ifearulundu Y., Kaneene J.B. (1997):** Epidemiology and economic impact of subclinical Johne's disease: a review. *Veterinary Bulletin*, 67, 437-447.
- Johnson-Ifearulundu Y., Kaneene J.B., Lloyd J.W. (1999):** Herd-level economic analysis of the impact of paratuberculosis on dairy herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 214, 822-825.
- Johnson-Ifearulundu Y. J., Kaneene, J.B., Sprecher, D.J. (1996):** The effect of subclinical Johne's disease on reproductive outcomes in dairy cattle: some preliminary results. In: *Proceedings of the 5th International Colloquium on Paratuberculosis*, 29th September to 4th October, 1996, Madison, Wisconsin, USA, ISBN 0-9633043-3-x (pbk.), 147-150.
- Johnson-Ifearulundu Y.J., Kaneene J.B., Sprecher D.J., Gardiner J.C., Lloyd J.W. (2000):** The effect of subclinical *Mycobacterium paratuberculosis* infection on days open in Michigan, USA, dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*, 46, 171-181.
- Johnson Y.J., Kaneene J.B., Gardiner J.C., Lloyd J.W., Sprecher D.J., Coe P.H. (2001):** The effect of subclinical *M. paratuberculosis* infection on milk production in Michigan dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 84, 2188–2194.
- Jones R.L. (1989):** Review of the economic impact of Johne's disease in the United States. In: *Johne's disease, Current Trends in Research Diagnosis and Management*. Victoria, Australia, CSIRO, 46–50.

- Julian R.J. (1975):** A short review and some observations on Johne's disease with recommendations for control. *Canadian Veterinary Journal*, 16, 33-43.
- Juste R.A., Marco J.C., De Ocariz C.S., Aduriz J.J. (1991):** Comparison of different media for isolation of small ruminants strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Veterinary Microbiology*, 28, 385-390.
- Kalis C.H.J., Hesselink J.W., Russchen E.W., Barkema H.W., Collins M.T., Visser I.J.R. (1999):** Factors influencing the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from bovine fecal samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11, 345-351.
- Kennedy D.J. (2007):** Developments in the Approach to Managing Paratuberculosis in Australia. In: *Bulletin of the International Dairy Federation, Proceedings of the 1st ParaTB Forum, Shanghai, China, 19th October, 2006, ISSN 0250-5118, 410/2007, 8-13.*
- Kennedy D.J., Benedictus G. (2001):** Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agricultural species. *Revue Scientifique et Technique – Office International des Epizooties*, 20 (1), 151-179.
- Kim S.G., Kim E.H. :, Lafferty C.J. :, Miller L.J., Koo H.J., Stehman S.M., Shin S.J. (2004) :** Use of conventional and real-time polymerase chain reaction for confirmation if *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in a broth-based culture system ESP II. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 16, 448-553.
- Koets A.P., Adugna G., Janss L.L.G., van Weering H.J., Kalis C.H.J., Wentink G.H., Rutten V.P.M.G., Schukken Y.H. (2000):** Genetic variation of susceptibility to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 83, 2702-2708.
- Körmendy B., Kopal T., Balint T., Szilagyi M., Beki L. (1989):** Economic losses caused by paratuberculosis in a dairy herd: case report. *Acta Veterinaria Hungarica*, 37, 45-53.
- Kudahl A., Nielsen S.S., Sørensen J.T. (2004):** Relationship between antibodies against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and shape of lactation curves. *Preventive Veterinary Medicine*, 62, 119-134.
- Kreeger J.M. (1991):** Ruminant paratuberculosis – a century of progress and frustration. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 3, 373-382.
- Kreeger J.M., Snider T.G., Olcott B.M. (1991):** Spontaneous murine thymocyte mitogenic activity consistent with interleukin-1 in cattle naturally infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 28, 317-326.

- Kreeger J.M., Snider T.G., Olcott B.M. (1992):** Measurement of lymphoblast proliferative capacity of stimulated blood mononuclear cells from cattle with chronic paratuberculosis. *American Journal of Veterinary Research*, 53, 392-395.
- Kruip T.A.M., Muskens J., van Roermund H.J.W., Bakker D., Stockhofe-Zurwieden N. (2003):** Lack of association of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with oocytes and embryos from moderate shedders of the pathogen. *Theriogenology*, 59, 1651-1660.
- Kvapilík J. (1995):** Ekonomické aspekty chovu skotu. Svaz chovatelů českého strakatého skotu. 67 ss.
- Kvapilík J. (2006):** Ekonomika chovu dojeného skotu, 172-184. In: Bouček J. a kol. Chov dojeného skotu, Praha, Profi Press, s.r.o., 186 ss.
- Kvapilík J., Růžička Z., Bucek P. a kol. (2009):** Reprodukce a inseminace skotu, 62-65. In.: Ročenka – Chov skotu v České republice. Českomoravská společnost chovatelů, a.s., 95 ss., ISBN 978-80-904131-2-2
- Lambeth C., Reddacliff L.A., Windsor P., Abbott K.A., McGregor H., Whittington R.J. (2004):** Intrauterine and transmammary transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep. *Australian Veterinary Journal*, 82, 504-508.
- Larsen A.B., Merkal R.S., Cutlip R.C. (1975):** Age of cattle as related to resistance to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *American Journal of Veterinary Research*, 36, 255–257.
- Larsen A.B., Moyle A.I., Himes E.M. (1978):** Experimental vaccination of cattle against paratuberculosis (Johne's disease) with killed bacterial vaccines: a controlled field study. *American Journal of Veterinary Research*, 39, 65-69.
- Larsen A.B., Stalheim O.H.V., Hughes D.E., Appell L.H., Richards W.D., Himes E.M. (1981):** *Mycobacterium paratuberculosis* in the semen and genital organs of a semen-donor bull. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 179, 169-171.
- Lombard J.E., Garry F.B., McCluskey B.J., Wagner B.A. (2005):** Risk of removal and effects on milk production associated with paratuberculosis status in dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 227, 1975–1981.
- López-Gatius F. (2003):** Is fertility declining in dairy cattle? A retrospective study in northeastern Spain. *Theriogenology*, 60, 89-99.
- Losinger W. (2005):** Economic impact of reduced milk production associated with Johne's disease on dairy operations in the USA. *Journal of Dairy Research*, 72, 425–432.

- Lynch D., Jordan K.N., Kelly P.M., Freyne T., Murphy P.M. (2007):** Heat sensitivity of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in milk under pilot plant pasteurization conditions. *International Journal of Dairy Technology*, 60, 98-104.
- Machackova-Kopecna M., Bartos M., Straka M., Ludvik V., Svastova P., Alvarez J., Lamka J., Trcka I., Treml F., Parmova I., Pavlik I. (2005):** Paratuberculosis and avian tuberculosis infections in one red deer farm studied by IS900 and IS901 RFLP analysis. *Veterinary Microbiology*, 105, 261-268.
- Marcé C., Beaudreau F., Bareille N., Seegers H., Fourichon C. (2007):** Effects of infection by *Mycobacterium avium* paratuberculosis on fertility of dairy cows. Proceedings of the 9th International Colloquium on Paratuberculosis, ²⁹October to ²November, Tsukuba, Japan. 114-115.
- Meadus W.J., Gill C.O., Duff P., Badoni M., Saucier L. (2008):** Prevalence on beef carcasses of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 291-294.
- Merkal R.S. (1984):** Paratuberculosis: Advances in cultural, serologic, and vaccination methods. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 184, 939-943.
- Merkal R.S., Larsen A.B., Booth G.D. (1975):** Analysis of the effects of inapparent bovine paratuberculosis. *American Journal of Veterinary Research*, 36, 837-838.
- Meyer A.L., Hall H.H. (1994):** Economic analysis of the impact of paratuberculosis on the Kentucky cattle industry. Agricultural economics staff paper 343, Department of Agricultural Economics University of Kentucky, USA.
- Mortensen H., Nielsen S.S., Berg P. (2004):** Genetic variation and heritability of the antibody response to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Danish Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 87 2108-2113.
- Muskens J., van Zijderveld F., Eger A., Bakker D. (2002):** Evaluation of the long-term immune response in cattle after vaccination against paratuberculosis in two Dutch dairy herds. *Veterinary Microbiology*, 86, 269 – 278.
- McCaughan C.J. (1989):** On-farm management of Johne's disease. In: Milner A.R., Wood P.R. (Eds.), *Johne's disease: Current trends in research, diagnosis and management*. CSIRO Publications, East Melbourne, Australia, 167pp.
- McDonald W.L., O'Riley K.J., Schroen Ch.J., Condrón R.J. (2005):** Heat inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 1785-1789.

- McDonald W.L., Ridge S.E., Hope A.F., Condrón R.J. (1999):** Evaluation of diagnostic tests for Johne's disease in young cattle. *Australian Veterinary Journal*, 77, 113-119.
- McKenna S.L.B., Keefe G.P., Tiwari A., VanLeeuwen J., Barkema H.W. (2006):** Johne's disease in Canada Part II: Disease impacts, risk factors, and control programs for dairy producers. *Canadian Veterinary Journal*, 47, 1089-1099.
- McNab W.B., Meek A.H., Martin S.W., Duncan J.R. (1991):** Associations between dairy production indices and lipoarabinomannan enzyme-immunoassay results for paratuberculosis. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 55, 356-361.
- Nauta M.J., van der Giessen J.W.B. (1998):** Human exposure to *Mycobacterium paratuberculosis* via pasteurized milk: a modelling approach. *Veterinary Record*, 143, 293-296.
- Nielsen S.S., Ersbøll A.K. (2006):** Age at occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in naturally infected dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89, 4557-4566.
- Nordlund K.V., Goodger W.J., Pelletier J., Collins M.T. (1996):** Associations between subclinical paratuberculosis and milk production, milk components, and somatic cell counts in dairy herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 208, 1872-1876.
- Ott S.L., Wells S.J., Wagner B.A. (1999):** Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Preventive Veterinary Medicine*, 40, 179-192.
- Otte M.J., Chilonda P. (2000):** Animal Health Economics: An Introduction. Animal Production and Healthy Division (AGA), FAO, Rome, Italy. 12 pp.
- Paisley L.G. (2001):** Economic aspects of disease monitoring with special reference to bovine paratuberculosis. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 94, 17-25.
- Pavlas M., Hanzlíková M., Štika V., Pavlík I. (1997):** Výskyt, diagnostika a tlumení paratuberkulózy skotu v českých zemích a na Slovensku. *Slovenský veterinársky časopis*, 22, 184-187.
- Pavlik I., Bölske, G., Englund, S., Dvorska, L., Du Maine, R., Svastova, P., Viske, D., Parmova, I., Bazant, J. (1999a):** Use of DNA fingerprinting for epidemiological studies of paratuberculosis in Sweden and the Czech Republic. In: Proceedings of the 6th International Colloquium on Paratuberculosis, 14th to 18th February, 1999, Melbourne, Victoria, Australia, ISBN 0-9633043-4-8 (pbk.), 176-187.
- Pavlik I., Horvathova A., Dvorska L., Bartl J., Svastova P., duMaine R., Rychlik I. (1999b):** Standardisation of restriction fragment length polymorphism analysis for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Journal of Microbiology Methods*, 38, 155-167.

- Pavlik I., Matlova L., Bartl J., Svastova P., Dvorska L., Whitlock R. (2000a):** Parallel faecal and organ *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* culture of different productivity types of cattle. *Veterinary Microbiology*, 77, 309-324.
- Pavlik I., Pavlas M., Bejckova L. (1994):** Incidence, economic importance and diagnosis of paratuberculosis. *Veterinarni Medicina*, 39, 451-496.
- Pavlik I., Rozsypalova Z., Vesely T., Bartl J., Matlova L., Vrbas L., Valent L., Rajskey D., Mracko I., Hirko M., Miskovic P. (2000b):** Control of paratuberculosis in five cattle farms by serological tests and faecal culture during the period 1990-1999. *Veterinarni Medicina*, 45, 61-70.
<http://www.vri.cz/docs/vetmed/45-3-61.pdf>
- Perry G.H., Vivanco H., Holmes I., Gwozdz J.M., Bourne J. (2006):** No evidence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in in vitro produced cryopreserved embryos derived from subclinically infected cows. *Theriogenology*, 66, 1267-1273.
- Raizman E.A., Fetrow J., Wells S.J., Godden S.M., Oakes M.J., Vazquez G. (2007):** The association between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* fecal shedding or clinical Johne's disease and lactation performance on two Minnesota, USA dairy farms. *Preventive Veterinary Medicine*, 78, 179-195.
- Rajala-Schultz P.J., Gröhn Y.T. (1999):** Culling of dairy cows. Part II. Effects of diseases and reproductive performance on culling in Finnish Ayrshire cows. *Preventive Veterinary Medicine*, 41, 279-294.
- Rajeev S., Shulaw W., Berghaus R., Zhang Y., Byrum B. (2006):** A testing scheme for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine faeces utilizing the ESP *para*-JEM liquid culture system. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18, 529-535.
- Richardson E.K.B., More S.J. (2009):** Direct and indirect effects of Johne's disease on farm and animal productivity in an Irish dairy herd. *Irish Veterinary Journal*, 62, 526-532.
- Richards W.D., Thoen C.O. (1977):** Effect of freezing on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces. *Journal of Clinical Microbiology*, 6, 392-395.
- Riemann H.P., Abbas B. (1983):** Diagnosis and control of bovine paratuberculosis (Johne's disease). *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*, 27, 481-503.
- Rideout B.A., Brown S.T., Davis W.C., Gay J.M., Giannella R.A., Hines II M.E., Hueston W.D., Hutchinson L.J. (2003):** Johne's disease in domesticated and wild animals, 16-37. In: *Diagnosis and control of Johne's disease*. National Research Council of the National Academies. The National Academies Press, Washington, D.C. (<http://www.nap.edu/>), 226 pp.

- Rosseels V., Huygen K. (2008):** Vaccination against paratuberculosis. Expert Review of Vaccines, 7, 817-832.
- Rossiter C.A., Burhans W.S. (1996):** Farm-specific approach to paratuberculosis (Johne's disease) control. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 12, 383-415.
- Rhode R.F., Shulaw W.P. (1990):** Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the uterine flush fluids of cows with clinical paratuberculosis. Journal of the American Veterinary Medical Association, 197, 1482-1483.
- Seitz S.E., Heider L.E., Hueston W.D., Bech-Nielsen S., Rings D.H., Spangler L. (1989):** Bovine fetal infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. Journal of the American Veterinary Medical Association, 194, 1423-1426.
- Sockett D.C. (1996):** Johne's disease eradication and control: regulatory implications. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 12, 431-440.
- Slana I., Kralik P., Kralova A., Pavlik I. (2008):** On-farm spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk studied by IS900 and F57 competitive real time quantitative PCR and culture examination. International Journal of Food Microbiology, 128 (12), 250-257.
- Spangler E., Bech-Nielsen S., Heider L.E. (1992):** Diagnostic performance of two serologic tests and fecal culture for subclinical paratuberculosis, and associations with production. Preventive Veterinary Medicine, 13, 185-195.
- Stabel J.R. (1997):** An improved method for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples and comparison to three other methods. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 9, 375-380.
- St.Jean G. (1996):** Treatment of clinical paratuberculosis in cattle. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 12, 417-430.
- St.Jean G., Jernigan A.D. (1991):** Treatment of *Mycobacterium paratuberculosis* infection in ruminants. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, 7, 793-804.
- Streeter R.N., Hoffsis G.F., Bech-Nielsen S., Shulaw W.P., Rings D.M. (1995):** Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. American Journal of Veterinary Research, 56, 1322-1324.
- Sweeney R.W. (1996):** Transmission of paratuberculosis. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 12, 305-312.
- Sweeney R.W., Hutchinson L.J., Whitlock R.H., Galligan D.T., Spencer P.A. (1994):** Effect of *Mycobacterium paratuberculosis* infection on milk production in dairy cattle. In:

- Proceedings of the 4th International Colloquium on Paratuberculosis, 17th to 21st July, 1994, Cambridge, UK, ISBN 0-9633043-2-1, 133-135.
- Sweeney R.W., Whitlock R.H., Rosenberger A.E. (1992a):** *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 166-171.
- Sweeney R.W., Whitlock R.H., Rosenberger A.E. (1992b):** *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from fetuses of infected cows not manifesting signs of the disease. *American Journal of Veterinary Research*, 53, 477-480.
- Sweeney R.W., Uzonna J., Whitlock R.H., Habecker P.L., Chilton P., Scott P. (2006):** Tissue predilection sites and effect of dose on *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* organism recovery in a short-term bovine experimental oral infection model. *Research in Veterinary Science*, 80, 253-259.
- Tiwari A., VanLeeuwen J.A., Dohoo I.R., Keefe G.P., Haddad J.P., Tremblay R., Scott H.M., Whiting T. (2007):** Production effects of pathogens causing Bovine Leukosis, Bovine Viral Diarrhoea, Paratuberculosis, and Neosporosis. *Journal of Dairy Science*, 90, 659-669.
- Tiwari A., VanLeeuwen J.A., Dohoo I.R., Keefe G.P., Weersink A. (2008):** Estimate of the direct production losses in Canadian dairy herds with subclinical *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Canadian Veterinary Journal*, 49, 569-576.
- Vandehaar M.J., Sharma B.K., Fogwell R.L. (1995):** Effect of dietary energy restriction on the expression of insulin-like growth factor-I in liver and *corpus luteum* of heifers. *Journal of Dairy Science*, 78, 832-841.
- VanLeeuwen J.A., Keefe G.P., Tiwari A. (2002):** Seroprevalence and productivity effects of infection with bovine leukemia virus, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, and *Neospora caninum* in maritime Canadian dairy cattle. *Bovine Practice*, 86-91.
- VanLeeuwen J., Tiwari A., Dohoo I., Keefe G., Haddad J., Tremblay R., Scott M., Whiting T. (2006):** Effects of bovine leucosis virus, bovine viral diarrhea virus, *Mycobacterium paratuberculosis*, and *Neospora caninum* on somatic cell count. Proceedings of the 11th Conference of the International Society of Veterinary Epidemiology and Economics, Cairns, Australia, 250.
- van Roermund H.J.W., Bakker D., Willemsen P.T.J., de Jong M.C.M. (2007):** Horizontal transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle in an experimental setting: Calves can transmit the infection to other calves. *Veterinary Microbiology*, 122, 270-279.

- van Schaik G.C., Kalis C.H., Benedictus G., Dijkhuizen A.A., Huirne R.B. (1996):** Cost-benefit analysis of vaccination against paratuberculosis in dairy cattle. *Veterinary Record*, 139, 624-627.
- van Schaik G.C., Stehman S.M., Schukken Y.H., Rossiter C.R., Shin S.J. (2003):** Pooled fecal culture sampling for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* at different herd sizes and prevalence. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 15, 233-241.
- Weber M.F., Kogut J., de Bree J., van Schaik G. (2005):** Evidence for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* shedding in young stock. In: Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Copenhagen, Denmark, 14-17th August, 2005, ISBN 0-9633043-6-4.
- Weber M.F., Nielen M., Velthuis A.G.J., van Roermund H.J.W. (2008):** Milk quality assurance for paratuberculosis: simulation of within-herd infection dynamics and economics. *Veterinary Research*, 39:12, 1-20.
- Weigel K.A., Gianola D., Yandell B.S., Keown J.F. (1993):** Identification of factors causing heterogeneous within-herd variance components using a structural model for variances. *Journal of Dairy Science*, 76, 1466–1478.
- Wells S.J., Wagner B.A. (2000):** Herd-level risk factors for infection with *Mycobacterium paratuberculosis* in US dairies and association between familiarity of the herd manager with the disease or prior diagnosis of the disease in that and use of preventive measures. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 216, 1450-1457.
- Wentink G.H., Bongers J.H., Zeeuwen A.A.P.A., Jaartsveld F.H. (1994):** Incidence of paratuberculosis after vaccination against *M. paratuberculosis* in two infected dairy herds. *Journal of Veterinary Medicine*, 41, 517-522.
- Wilson D.J., Rossiter Ch., Han H.R., Sears P.M. (1993):** Association of *Mycobacterium paratuberculosis* infection with reduced mastitis, but with decreased milk production and increased cull rate in clinically normal dairy cows. *American Journal of Veterinary Research*, 54, 1851–1857.
- Wilson D.J., Rossiter Ch., Han H.R., Sears P.M. (1995):** Financial effects of *Mycobacterium paratuberculosis* on mastitis, milk production, and cull rate in clinically normal cows. *Agri-Practice*, 16, 12-18.
- Wiltbank M., Lopez H., Sartori R., Sangsritavong S., Gümen A. (2006):** Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology*, 65, 17-29.

- Windsor P.A., Whittington R.J. (2009):** Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. *The Veterinary Journal* [Epub ahead of print], doi:10.1016/j.tvjl.2009.01.007
- Wu Ch., Livesey M., Schmoller S.K., Manning E.J.B., Steinberg H., Davis W.C., Hamilton M.J., Talaat A.M. (2007):** Invasion and persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infection and Immunity*, 75, 2110-2119.
- Whipple D.L. (1991):** Prevalence and economic impact of paratuberculosis. In: Proceedings of the 3rd International Colloquium on Paratuberculosis, Orlando, Florida, USA, 28th September to 2nd October, 1991, ISBN 0-9633043-0-5, 382–389.
- Whitlock R.H., Buergelt C. (1996):** Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 12, 383-415.
- Whitlock R.H., Hutchinson L.T., Merkal R.S., Glickman L.T., Rossiter C., Harmon S., Spencer P., Fetrow J., Bruce J., Benson C.E., Dick J. (1985):** Prevalence and economic consideration of Johne's disease in the North Eastern U.S. In: Proceedings of the 89th Annual Meeting of the USAHA, Milwaukee, Wisconsin, USA, 89, 484–490.
- Whitlock R.H., Rosenberger A.E., Sweeney R.W., Spencer P.A. (1996):** Distribution of *M. paratuberculosis* in tissues of cattle from herds infected with Johne's disease. In: Proceedings of the 5th International Colloquium on Paratuberculosis, 29th September to 4th October, 1996, Madison, Wisconsin, USA, ISBN 0-9633043-3-x, 168-174.
- Whitlock R.H., Wells S.J., Sweeney R.W., Van Tiem J. (2000):** ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Veterinary Microbiology*, 77, 387-398.
- Whittington R.J., Sergeant S.G. (2001):** Progress towards understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Australian Veterinary Journal*, 79, 267-278.
- 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, 60-69.

9. SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

Publikace v časopisech s IF:

- Hasonova L.**, Trcka I., Babak V., Rozsypalova Z., Pribylova R., Pavlik I. (2009): Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissues of naturally infected cattle as affected by age. *Veterinarni Medicina*, 54 (6), 257-269.
- Jelinek F., Barton R., Posekana J., **Hasonova L.** (2007): Gynecomastia in a tom-cat caused by cyproteron acetate. *Veterinarni Medicina*, 52 (11), 521-525.
- Hasonova L.**, Pavlik I. (2006): Economic impact of paratuberculosis in dairy cattle herds: a review. *Veterinarni Medicina*, 51 (5), 193-211.

Publikace v odborných recenzovaných časopisech:

- Hasoňová L.**, Pavlík I., Kříž P. (2008): Původce paratuberkulózy – vlastnosti, jež komplikují ozdravování chovů. *Náš chov*, LXVIII (7), 22-25.
- Hasoňová L.**, Pavlík I., Trčka I. (2006): Paratuberkulóza mléčného skotu. *Náš chov*, LXVI (6), 35-39.

Publikace v odborných časopisech:

- Hasoňová L.** (2005): Paratuberkulóza u dojených plemen skotu a její význam. *Agromagazín*, 11, 48-50.

Ostatní:

- Hasoňová L.**, Kursa J., Konečný R. (2007): Závěrečná zpráva grantu FRVŠ 329/2007 „Paratuberkulóza v chovech dojených plemen skotu.“
- Hasoňová L.**, Kursa J. (2006): Závěrečná zpráva interního grantu 14/2005 „Význam paratuberkulózy v chovech mléčného skotu.“
- Hasoňová L.**, Pavlík I. (2004): Paratuberkulóza v chovu mléčného skotu plemene Jersey – zpráva pro Mze ČR.