

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

KATEDRA VETERINÁRNÍCH DISCIPLÍN A KVALITY PRODUKTŮ

STUDIJNÍ PROGRAM: Zootechnika

STUDIJNÍ OBOR: Zootechnika

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Problematika paratuberkulózy v chovech mléčného skotu v České
republice**

(The issue of paratuberculosis in dairy cattle herds in the Czech
Republic)

Autor bakalářské práce: **Lukáš Štěrba**

Vedoucí bakalářské práce: **MVDr. Lucie Hasoňová, Ph.D.**

České Budějovice

2013

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Lukáš ŠTĚRBA**
Osobní číslo: **Z10548**
Studijní program: **B4103 Zootechnika**
Studijní obor: **Zootechnika**
Název tématu: **Problematika paratuberkulózy v chovech mléčného skotu v České republice**
Zadávací katedra: **Katedra veterinárních disciplin a kvality produktů**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Úvod a cíl: Paratuberkulóza je chronické onemocnění gastrointestinálního traktu skotu a ostatních přežvýkavců, jehož původcem je *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Do roku 1989 byl výskyt tohoto závažného onemocnění na našem území zcela ojedinělý a izolovaný. Po roce 1989 doznala nálezová situace v České republice významného zhoršení po četných dovozech březích jalovic, zejména holštýnského plemene, z různých států především západní Evropy. I přes zvýšený veterinární dozor, který trval u všech dovezených stád dva roky, se nepodařilo včas odhalit všechna infikovaná zvířata. V současné době je stále větší kritika k metodám tlumení paratuberkulózy skotu, kterou vyvolávají pochybnosti o správnosti postupů eliminace této nebezpečné nákazy u nás. Důkazem této skutečnosti je často mnohaleté úsilí, kterým se daří pouze omezit výskyt klinických forem nákazy. Za hlavní příčinu neúspěchů při tlumení paratuberkulózy se považuje nerespektování základních poznatků o patogenезi, etiologii a diagnostice této nákazy. Prvořadým předpokladem efektivního tlumení nákazy je spolehlivá diagnostika.

Cílem bakalářské práce je vypracovat literární přehled na téma paratuberkulóza u mléčného skotu, seznámit se s touto nebezpečnou nákazou, s jejím šířením, patogenезí, diagnostikou.

Literární přehled: Současný stav poznání dané problematiky, zpracovaný na základě studia odborné a vědecké literatury.

Závěr: Shrnutí získaných informací, návrhy a doporučení, vyplývající ze studované problematiky.

Abstrakt: Přehled nejdůležitějších poznatků - v českém a anglickém jazyce, včetně klíčových slov.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy: 25-35 stran

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

- Bednář M. a kol.: Lékařská speciální mikrobiologie a parazitologie. Praha: Triton, 1994. ISBN 80-901521-4-7.
- Hasonova L., Pavlík I.: Economic impact of paratuberculosis in dairy cattle herds: a review. Veterinarni Medicina, 2006, 51: 193-211.
- Hasonova L., Trcka I., Babak V., Rozsypalova Z., Pribylova R., Pavlík I.: Distribution of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in tissues of naturally infected cattle as affected by age. Veterinarni Medicina, 2009, 54: 257-269.
- Khol J.L., Beran V., Kralik P., Trckova M., Pavlík I., Baumgartner W.: Grass silage contaminated with Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis (MAP): possible source of paratuberculosis infection in ruminants? Veterinarni Medicina, 2010, 55: 225-232.
- Tiwari A., VanLeeuwen J.A., McKenna S.L., Keefe G.P., Barkema H.W.: Johne's disease in Canada: Part I: Clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. The Canadian Veterinary Journal, 2006, 47(9): 874-882.
- McKeenna S.L., Keefe G.P., Tiwari A., VanLeeuwen J.A., Barkema H.W.: Johne's disease in Canada part II: disease impacts, risk factors, and control programs for dairy producers. The Canadian Veterinary Journal, 2006, 47 (11): 1089-99.

podle ČSN ISO 690 (010197)

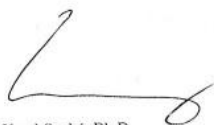
Vedoucí bakalářské práce:

MVDr. Lucie Hasoňová, Ph.D.

Katedra veterinárních disciplín a kvality produktů

Datum zadání bakalářské práce: 8. března 2012

Termín odevzdání bakalářské práce: 15. dubna 2013



Ing. Karel Suchý, Ph.D.

proděkan pověřený vedením ZF

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studená 13
370 05 České Budějovice



prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.

vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 8. března 2012

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci na téma „Problematika paratuberkulózy v chovech mléčného skotu v České republice“ jsem vypracoval samostatně a použil jen pramenů, které cituji a uvádím v příloženém seznamu literatury.

Také prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích 26. 3. 2013

.....
Lukáš Štěrba

Poděkování

Chtěl bych poděkovat především mé vedoucí bakalářské práce paní MVDr. Lucii Hasoňové, Ph.D. za odborné vedení, metodickou pomoc při vypracování mé práce a za trpělivost.

ABSTRAKT

Paratuberkulóza je způsobena *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*MAP*). Nejvnímavější k infekci *MAP* jsou telata mladší 6 měsíců. K nakažení nejčastěji dochází výkaly, kontaminovaným mlékem a fekálně kontaminovaným krmivem a vodou. I když vylučování *MAP* většinou nezačíná dříve jak ve věku 18 měsíců, ukázalo se, že k vylučování *MAP* může dojít již u velmi mladých telat. Klinické příznaky (průjem a ztráta hmotnosti) se nejčastěji projevují ve stáří 3 - 6 let. Onemocnění končí smrtí postiženého zvířete v důsledku dehydratace a kachexie. Subklinicky infikovaní jedinci nevykazují klinické příznaky paratuberkulózy, ale vylučují vysoké množství *MAP* ve svých výkalech. Mezi nejčastěji používané diagnostické laboratorní testy patří vyšetření nátěrů obarvených Ziehl-Neelsenem, kultivační metody, PCR a ELISA test. Paratuberkulóza je obtížně diagnostikovatelná a neléčitelná choroba, a proto je velice důležité zavádět kontrolní programy v *MAP* pozitivních stádech a zabránit šíření onemocnění do negativních stád. V roce 2008 byl v ČR vydán metodický návod, který je založen pouze na diagnostice ELISA testem a eliminuje pouze klinické formy nemoci ve stádě. *MAP* je často dáváno do souvislosti se vznikem Crohnovy choroby u lidí.

Klíčová slova: paratuberkulóza; *MAP*

ABSTRACT

Paratuberculosis is caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*MAP*). Calves younger than six months of age are the most susceptible to *MAP* infection. Infection is most commonly transmitted by faeces, contaminated milk and faeces-contaminated feed and water. Although eliminating *MAP* is considered not to begin before 18 months of age, it has been shown that also young calves can eliminate *MAP*. Most clinical symptoms (diarrhoea and weight loss) occur between 3-6 years of age. The disease ends with the death of the affected animal due to dehydration and cachexia. Subclinically infected adult animals do not show clinical signs of paratuberculosis, but eliminate high quantities of *MAP* in their faeces. Ziehl-Neelsen staining, cultivation methods, PCR and ELISA test are the most commonly used diagnostic laboratory tests. Paratuberculosis is difficult to diagnose and cure, therefore it is very important to introduce and carry out inspection programmes in *MAP* positive herds in order to prevent spreading the disease into negative herds. In 2008, the Czech Republic released a methodological guide which is based solely on diagnostic ELISA test eliminating only clinical forms of the disease in the herd. *MAP* has been suggested as a possible cause of Crohn's disease of humans.

Key words: paratuberculosis; *MAP*

SEZNAM NEJČASTĚJI POUŽÍVANÝCH ZKRATEK

CD	Crohnova choroba (Crohn's disease)
EMA	Ethidium monoazid
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
HPC	Hexadecylpyridinium chlorid
IS	Vložená sekvence (insertion sequence)
KVS	Krajská veterinární správa
<i>MAP</i>	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>
MN	Metodický návod
PANTA	Směs antibiotik (polymyxin B, amphotericin B, kyselina nalidixová, trimetoprim a azlocilin)
PCR	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
PMA	Propidium monoazid
SVS ČR	Státní veterinární správa České republiky
VAN	Směs antibiotik (vankomycin, kyselina nalidixová a amphotericin B)
qPCR	Kvantitativní PCR (real time PCR)

OBSAH

	Abstrakt	
	Seznam nejčastěji používaných zkratk	
1	Úvod a cíl	10
2	Historie paratuberkulózy	11
3	Původce paratuberkulózy	12
3.1	Buněčná stěna.....	12
3.2	Genetika	12
3.3	Přežívání ve vnějším prostředí a odolnost k vnějším faktorům	13
3.4	Hostitelé	14
3.5	Způsoby nakažení a šíření původce ve stádě	14
4	Patogeneze.....	16
5	Klinické příznaky	17
6	Diagnostika.....	18
6.1	Přímé metody	19
6.1.1	Barvení dle Ziehl-Neelsena.....	19
6.1.2	Bakteriální kultivace	19
6.1.3	Polymerázová řetězová reakce	20
6.2	Nepřímé metody.....	22
6.2.1	ELISA test	22
7	Ekonomický dopad paratuberkulózy	23
7.1	Přímé ztráty	24
7.2	Nepřímé ztráty.....	25
8	Crohnova choroba	25
9	Nákazová situace paratuberkulózy	27
10	Prevence a tlumení paratuberkulózy	28
11	Tlumení paratuberkulózy v České republice.....	29
12	Certifikační program	30
13	Závěr.....	32
14	Seznam použité literatury	34

1 Úvod a cíl

Paratuberkulóza je chronické onemocnění skotu a ostatních přežvýkavců, jehož původcem je *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Díky své dlouhé inkubační době, vysokým ekonomickým ztrátám, obtížnosti včasné diagnostiky a možné souvislosti s Crohnovou chorobou u lidí je v současnosti jedním z nejvýznamnějších onemocnění přežvýkavců. Do roku 1989 byl výskyt tohoto závažného onemocnění na našem území zcela ojedinělý a izolovaný. Po roce 1989 ovšem doznala nakažová situace v České republice významného zhoršení po četných dovozech březích jalovic, zejména holštýnského plemene, z různých států především západní Evropy. I přes zvýšený veterinární dozor, který trval u všech dovezených stád dva roky, se nepodařilo včas odhalit všechna infikovaná zvířata. V současné době je stále větší kritika k metodám tlumení paratuberkulózy skotu, kterou vyvolávají pochybnosti o správnosti postupů eliminace této nebezpečné nákazy u nás. Důkazem této skutečnosti je často mnohaleté úsilí, kterým se daří pouze omezit výskyt klinických forem nákazy. Za hlavní příčinu neúspěchů při tlumení paratuberkulózy se považuje nerespektování základních poznatků o patogenезi, etiologii a diagnostice této nákazy. Prvořadým předpokladem efektivního tlumení nákazy je spolehlivá diagnostika.

Cílem bakalářské práce je vypracovat literární přehled o paratuberkulóze u mléčného skotu, seznámit se s touto nebezpečnou nákazou, s jejím šířením, patogenезí a diagnostikou. Pokud se dobře seznámíme s touto nákazou teoreticky, bude pak pro nás jednodušší tyto poznatky aplikovat v praxi.

2 Historie paratuberkulózy

Už v polovině roku 1820 bylo stále častěji zaznamenáváno vysilující střevní onemocnění skotu, ale v této době nebylo dobře popsáno a jeho příčina nebyla známa. Dalších sedmdesát let byla tudíž tato nemoc považována za onemocnění neznámé etiologie (Chiodini, 2005).

Významnějšího pokroku dosáhli v roce 1894 v Drážďanech Dr. Heinrich Albert Johne a jeho kolega z Bostonu Langdon Fronthingham, kteří zkoumali střevo a žaludek od uhynulé krávy, která trpěla střevním onemocněním. Povšimli si zahuštěné střevní sliznice a zvětšených mezenterálních lymfatických uzlin (Manning a Collins, 2010). Johne a Fronthingham došli k závěru, že pozorovaná nemoc u krávy byla způsobena bakterií, která způsobuje ptačí tuberkulózu. Navrhli tedy jméno „pseudotuberculous enteritis“ (Manning a Collins, 2010).

V roce 1906 nemoc upoutala pozornost i dánského veterinárního lékaře Bernharda Banga, který prokázal, že infikovaná zvířata nereagují na antigeny používané při tuberkulinaci a vyloučil tudíž původce tuberkulózy jako příčinu zkoumané choroby (Manning a Collins, 2010). Navrhl pro zkoumané onemocnění název paratuberkulóza, tj. připomínající tuberkulózu (Chiodini, 2005). V témže roce John McFadyean, hlavní postava britského veterinárního výzkumu, vytvořil pro toto onemocnění název Johnova choroba (Johne's disease) (Manning a Collins, 2010).

V roce 1910 se nezávisle na sobě podařilo Twortovi v Anglii a Holthovi v Norsku izolovat původce nemoci. Díky izolaci původce a extraktu jeho antigenů, byla otevřena brána pro řadu experimentů týkající se biologie a patogenity tohoto organismu a rozvoje diagnostických testů. Twort navrhl název pro původce *Mycobacterium enteriditis chronicae pseudotuberculosis bovis johne* (Chiodini, 2005). V roce 1923 byla zveřejněna první Bergeyova příručka a nemoc získala oficiální označení paratuberkulóza a její původce *Mycobacterium paratuberculosis* (Chiodini, 2005). V roce 1990 Marie Thorel a její spolupracovníci došli k závěru, že *M. paratuberculosis* patří ke komplexu *M. avium* a navrhli proto nový název *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (Chiodini, 2005).

3 Původce paratuberkulózy

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (*MAP*) je malá (0,5 x 1,5 µm), pomalu rostoucí, acidoalkoholrezistentní, tyčinkovitá bakterie, která je kultivovatelná pouze na živné půdě obsahující mykobaktin. Barví se podle Ziehl-Neelsena (Collins, 2003a; Khol a Baumgartner, 2011).

3.1 Buněčná stěna

MAP má silnou buněčnou stěnu tvořenou z 60 % lipidy (Rowe a Grant, 2006). Mezi hlavní složky patří lipoarabinomannan, arabinomannan a mykolové kyseliny (Tessema et al., 2001). Díky vysokému obsahu lipidů je buněčná stěna acidoalkoholrezistentní, což znamená, že je složité ji obarvit organickými barvivy a následně je odolná k odbarvení kyselinami a alkoholem (Bhatt et al., 2007), dále je hydrofobní a má zvýšenou odolnost vůči chemikáliím (např. chlóru) a fyzikálním procesům (např. pasterizaci) (Rowe a Grant, 2006). Vysoký obsah lipidů v buněčné stěně je hlavní příčinou dlouhého přežívání *MAP* v prostředí (Khol a Baumgartner, 2011). Pomalý růst *MAP* je zapříčiněn omezeným příjmem živin přes buněčnou stěnu (Rowe a Grant, 2006).

3.2 Genetika

Analýzy sekvence genomu *MAP* K-10 ukázaly, že má jeden kruhový sled 4 829 781 bp („base pair“ páry bází), s obsahem G (Guanin) + C (Cytosin) 69,30 %. Obsahuje 4350 otevřených čtecích rámců, 45 tRNA, 1 rRNA operon, 0 plasmidů. *MAP* má genom složený přibližně z 1,5 % repetitivních sekvencí, které zahrnují celkem 58 vkládaných prvků (Li et al., 2009). Analýza zjistila v K-10 genomu 17 kopií vložené sekvence IS900, sedm kopií IS1311 a tři kopie ISMav2. Dva nově objevené IS prvky, IS MAP02 přítomný v šesti kopiích a IS MAP04 přítomný ve čtyřech kopiích, mohou sloužit jako nové cíle pro detekci *MAP*, neboť nejsou přítomny v jiných mykobakteriích (Li et al., 2005).

3.3 Přežívání ve vnějším prostředí a odolnost k vnějším faktorům

MAP může přežívat dlouhou dobu ve vnějším prostředí. Rowe a Grant (2006); Khol et al. (2010a); Khol a Baumgartner (2011) uvádějí, že *MAP* přežívá až 55 týdnů ve vnějším prostředí. *MAP* dokáže v hnoji skladovaném ve stinném místě přežívat až 55 týdnů (Whittington et al., 2004; Khol et al., 2010a; Khol a Baumgartner, 2011). *MAP* přežívá až 24 týdnů na trávě, která vyrostla na půdě hnojené infikovaným hnojem (Whittington et al., 2004).

Vysoká teplota, UV záření, nízké pH a vlhkost snižují dobu přežívání *MAP* ve vnějším prostředí (Khol et al., 2010a; Khol a Baumgartner, 2011). Podle Whittingtona et al. (2004) aplikace vápna do půdy a UV záření neovlivňují dobu přežívání *MAP*.

Jiné studie se zabývají dobou přežívání ve vodě. *MAP* přežívá až 120 týdnů v jezerech (Khol et al., 2010a; Khol a Baumgartner, 2011), 9 měsíců v rybníce, 160 dní v řece (Baumgartner a Khol, 2006) a v přehradách až 48 týdnů (Rowe a Grant, 2006). Collins (2003a) uvádí, že ve vodě při neutrálním pH (7,0) byl *MAP* přítomen 17 měsíců, ovšem Whittington et al. (2004) tvrdí, že tato doba činí až 19 měsíců. Dále je podle Collinse (2003a) doba přežívání při pH 5,0 a pH 8,5 jen 14 měsíců, ale podle Whittingtona et al. (2004) *MAP* přežívá při těchto hodnotách pH až 17 měsíců. Vyšší i nižší pH vody tedy zkracuje dobu přežívání *MAP*.

Whittington et al. (2004) ve své práci zkoumali vliv teploty na dobu přežívání *MAP*. Zjistili, že *MAP* přežívá při 15 °C 98-112 dní, při 35 °C už jen 21-28 dní a při 53-55 °C jen 1 den. Dále také zjistili, že *MAP* přežívá v suchém plně zastíněném prostředí až 55 týdnů, kdežto v nezastíněném prostředí je tato doba kratší, což je pravděpodobně způsobeno vyšší teplotou v nezastíněném prostředí. Podle Baumgartnera a Khol (2006) může *MAP* zůstat životaschopný i při teplotách -14 °C po dobu delší než 1 rok.

MAP je odolný proti běžným dezinfekčním prostředkům. Proti *MAP* jsou účinné fenolové dezinfekční prostředky a dále pak komerční dezinfekční prostředky označeny jako "tuberkulocidní" (Collins, 2003a; Baumgartner a Khol, 2006).

3.4 Hostitelé

Mezi nejčastěji infikované druhy zvířat patří přežvýkavci (skot, ovce, kozy, jeleni, losi, antilopy, bizoni atd.) a velbloudovití (Collins, 2003a).

Infekce *MAP* byly popsány také u monogastrických druhů, jako jsou divoká prasata, ptáci (Álvarez et al., 2005), myši, krysy, zajáci, lišky (Florou et al., 2008), králíci (Judge et al., 2005), medvědi a primáti (Klee, 2006). *MAP* byl také hlášen u koní a mul (Li et al., 2009). Na rozdíl od přežvýkavců však monogastrické druhy nevykazují klinické příznaky paratuberkulózy (Khol a Baumgartner, 2011).

MAP byl rovněž izolován ze střevní tkáně, z mateřského mléka i krve lidí stížených Crohnovou chorobou (Fixa et al., 2010).

3.5 Způsoby nakažení a šíření původce ve stádě

Do většiny stád se *MAP* dostane nákupem infikovaných asymptomatických zvířat (Khol a Baumgartner, 2011). Za pravděpodobnou je považována také cesta přenosu semenem (Khol et al., 2010b). Možný je i přenos z divoce žijících druhů zvířat, která mohou svými výkaly kontaminovat pastviny používané pro skot. Tyto pastviny mohou být kontaminovány volně žijícími přežvýkavci, jako jsou jeleni (*Cervus elaphus*), daňci (*Dama dama*), mufloni (*Ovis musimon*) a srnci (*Capreolus capreolus*) (Kopecna et al., 2008). *MAP* byl ale izolován i u některých nepřežvýkavých volně žijících druhů. Největší riziko přenosu z těchto zvířat představuje králík (*Oryctolagus cuniculus*) vzhledem k vyšší promořenosti (Judge et al., 2005), ovšem v České republice spíše divoká prasata (*Sus scrofa*), neboť jejich populace jsou zde velmi vysoké (Kopecna et al., 2008).

K infekci *MAP* dochází nejčastěji u telat mladších 6 měsíců, neboť tato jsou k infekci nejvýmavější (Windsor a Whittington, 2010). Infikován může být i dospělý skot (Khol a Baumgartner, 2011), ale ten již není k infekci tak citlivý, protože funkční bachor u dospělých zvířat pravděpodobně negativně ovlivňuje *MAP* (Windsor a Whittington, 2010).

Nejvýznamnější cestou infekce je fekálně-orální přenos například z kontaminovaného prostředí, krmiva, vody a vemene (pokud tele pije od matky) (Baumgartner a Khol, 2006; Windsor a Whittington, 2010; Khol a Baumgartner, 2011). Zdrojem infekce může být i mlezivo a mléko od asymptomatických krav (Baumgartner a Khol, 2006; Windsor a Whittington, 2010; Khol a Baumgartner, 2011). K nakažení telete může dojít již v děloze, ale rizika nitroděložní infekce jsou obecně považována za nízká (Windsor a Whittington, 2010). Meta-analytická studie prokázala, že pravděpodobnost narození infikovaného plodu u subklinicky nemocné krávy je 9 %, zatímco u krávy s klinickým onemocněním 39 % (Whittington a Windsor, 2009). Hasonova et al. (2009) izolovali *MAP* ze dvou plodů (11,1 %) z celkových 18 pocházejících od 16 infikovaných krav (dvě krávy porodily dvojčata). U jednoho plodu byl *MAP* izolován z jater a dokonce i ze střevní sliznice. Tento plod pocházel od matky, která měla masivní infekci *MAP* v mnoha tkáních.

U infikovaného skotu dochází k vylučování *MAP* ve výkalech do vnějšího prostředí většinou až u zvířat starších 18 měsíců (Khol a Baumgartner, 2011), což může být způsobeno různými stresovými faktory spojenými právě s tímto věkem (např. první porod, první laktace) (Windsor a Whittington, 2010). Ukázalo se však, že již i velmi mladá infikovaná telata mohou vylučovat *MAP* ve výkalech a mohou tedy působit jako zdroj infekce (Bolton et al., 2005; Weber et al., 2005; Baumgartner a Khol, 2006). Hasonova et al. (2009) ve svém výzkumu prokázali vylučování *MAP* výkaly u pětíměsíčního telete.

4 Patogeneze

Primárním místem infekce *MAP* je kyčelník (*ileum*) (Baumgartner a Khol, 2006). *MAP* prochází střevní slizniční bariérou přes M-buňky, které se nacházejí v epitelu ležícím na Peyerových placích (Tessema et al., 2001). *MAP* obsahuje bílkovinu fibronektin, M-buňky zase bílkovinu integrin. Vznik vazby mezi těmito bílkoviny umožňuje vstup mykobakterií do M-buněk. Tento vniklý antigen je poté fagocytován makrofágem (Woo a Czuprynski, 2008). Makrofágy se snaží mykobakterie zničit pomocí fagolysosomu. Lysosomální vakuoly obsahují silné hydrolytické enzymy (Woo a Czuprynski, 2008). Mykobakterie dokáží zabránit enzymatickým a toxickým útokům uvnitř makrofágů, např. lipoarabinomannan je silný inhibitor aktivace makrofágů (Tessema et al., 2001). *MAP* tedy nakonec uvnitř makrofágů může přežít a množit se. Makrofág se časem protrhne a *MAP* se dostane do okolní tkáně (Tessema et al., 2001). Uvnitř makrofágů může *MAP* migrovat i do mezenteriálních mízních uzlin a přes *ductus thoracicus* se dostává i do krevního řečiště (Baumgartner a Khol, 2006), a proto je možné později detekovat *MAP* i v mléčné žláze, v plicích a v játrech (Fecteau a Whitlock, 2010).

V raných fázích infekce imunitní systém reaguje na invazi náborem většího množství makrofágů a lymfocytů do místa infekce. Makrofágy se spojí a tvoří velké vícejaderné buňky. V důsledku těchto procesů dochází v průběhu let k viditelnému zahušťování střevní stěny, slizniční povrch se stává vlnitým a zrnitým, hovoříme o granulomatózním zánětu. V posledních fázích této infekce zvíře začne produkovat cirkulující protilátky proti *MAP*, které ale neposkytují ochranu proti množení mykobakterií. Detekce protilátek bývá indikátorem blížícího se propuknutí klinických příznaků onemocnění a event. následného úmrtí (Collins 2003b).

5 Klinické příznaky

V důsledku dlouhé inkubační doby se první klinické příznaky paratuberkulózy, jako je průjem a ztráta hmotnosti, obvykle neobjevují před dovršením druhého roku života (Khol a Baumgartner, 2011), k jejich propuknutí ve většině případů dochází ve stáří 3 - 6 let (Baumgartner a Khol, 2006).

Paratuberkulóza probíhá u mladých jedinců do 2 let věku latentně (Wiszniewska-Łaszczych et al., 2010). Dochází u nich k občasnému vylučování *MAP* ve výkalech. (Fecteau a Whitlock, 2010). Následně onemocnění přechází do tzv. subklinické fáze. V této fázi nedochází k projevům klinických příznaků paratuberkulózy, ovšem jedinci mívají jiné zdravotní problémy, jako jsou poruchy plodnosti, onemocnění mléčné žlázy a končetin. Z těchto důvodů jsou zvířata již často vyřazena ze stáda (Fecteau a Whitlock, 2010). U zvířat v této fázi dochází k vylučování většího počtu *MAP* ve výkalech (Wiszniewska-Łaszczych et al., 2010) a tito působí jako “skrytí přenašeči” (Khol a Baumgartner, 2011).

Doba od subklinické fáze až do propuknutí prvních klinických příznaků je velmi variabilní a je pravděpodobně ovlivněna celou řadou faktorů, které mohou zahrnovat: věk v době nakažení, dávku *MAP* při nakažení, genetické faktory hostitele a původce, faktory životního prostředí, nutriční faktory a různé stresové faktory (Fecteau a Whitlock, 2010). Paratuberkulóza se postupně začne projevovat nepravidelným průjmem, poklesem hmotnosti a to i přes to, že příjem krmiva zůstává neovlivněn. Postupně se rozvíjí vyhublost až kachexie. Tepová frekvence, dechová frekvence a teplota jsou normální. Snižuje se i produkce mléka (Fecteau a Whitlock, 2010; Wiszniewska-Łaszczych et al., 2010). S rozvojem nemoci dochází k chronickému průjmu. Zvířata jsou vyhublá a velmi slabá. Dalším klinickým příznakem je intermandibulární edém (“lahvovitá čelist”). Paratuberkulóza je neléčitelná a dochází tedy nakonec k úmrtí v důsledku dehydratace a kachexie (Fecteau a Whitlock, 2010; Khol a Baumgartner, 2011).

Průběh nemoci bývá rozdělován do 4 etap (Fecteau a Whitlock, 2010; Khol a Baumgartner, 2011) (**Tab. 1**).

Tabulka 1: **Předpokládaná prevalence paratuberkulózy ve stádě s jedním klinicky nemocným jedincem**

Etapa	Typ infekce	Počet zvířat
I.	Tichá infekce telat nebo mladého skotu (latentní stádium)	15-25
II.	Skrytí dospělí přenašeči (subklinická fáze)	6-8
III.	Klinické onemocnění	1-2
IV.	Pokročilé klinické onemocnění	1

Zdroj: Fecteau a Whitlock (2010)

6 Diagnostika

Klinické případy paratuberkulózy lze většinou diagnostikovat na základě klinického vyšetření, anamnézy nebo pitevních nálezů. Pokud chybí klinické symptomy, je nutné použít laboratorní testy pro vyloučení nebo potvrzení diagnózy. Bohužel dnes nejsou k dispozici žádné laboratorní testy pro diagnostiku paratuberkulózy s vysokou senzitivitou a specificitou. Diagnostika paratuberkulózy je u subklinicky nemocného skotu problematická (Khol a Baumgartner, 2011).

Používané laboratorní testy lze rozdělit na přímé metody, jako je například vyšetření nátěrů obarvených Ziehl-Neelsenem, kultivační metody a Polymerase Chain Reaction (PCR), a nepřímé metody, které vyhodnocují imunitní odpověď organismu, jako je Agar Gel Immunodiffusion (AGID), Complement Fixation Test (CFT) a Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Baumgartner a Khol, 2006; Khol a Baumgartner, 2011). Diagnostika je však obtížná u mladých zvířat a zvířat v raném stadiu infekce. Volba vhodného diagnostického nástroje, kombinace přímých a nepřímých testů a opakované vyšetření zvířat a stád jsou nejdůležitějšími klíči k úspěchu při diagnostice paratuberkulózy (Khol a Baumgartner, 2011).

6.1 Přímé metody

6.1.1 Barvení dle Ziehl-Neelsena

Detekce *MAP* ve výkalech pomocí Ziehl-Neelsenova barvení představuje levný, rychlý a snadný způsob jak potvrdit diagnózu klinických případů paratuberkulózy. Bohužel tato metoda má nízkou senzitivitu pro odhalení subklinicky infikovaných zvířat (Khol a Baumgartner 2011).

6.1.2 Bakteriální kultivace

Bakteriální kultivace vzorků je považována za „zlatý standard“ pro detekci *MAP* (Slana et al., 2008b). Specificita kultivace výkalů dosahuje 98 % a senzitivita 70 % u skotu s klinickou paratuberkulózou. Senzitivita však klesá na 23-49 % u subklinicky nemocných jedinců. Pro snížení nákladů na bakteriální kultivaci lze připravit směsný fekální vzorek až od 5 krav (Khol a Baumgartner, 2011).

Kultivovaný materiál (výkaly, tkáň, mléko atd.) musí být vždy dekontaminován za účelem inhibice přítomné mikroflóry (Whittington, 2010). Ačkoliv je *MAP* k této dekontaminaci relativně odolné, přece jen dochází k poškození mnoha bakteriálních buněk, a tedy pro úspěšnou kultivaci musí být ve vyšetřovaném vzorku minimálně 1000 až 10000 buněk *MAP* (Pavlík et al., 2011). K dekontaminaci se nejčastěji používá hexadecylpyridinium chlorid (HPC). Je nejméně škodlivé pro *MAP* a neefektivnější na zabíjení jiných mikroorganismů (Slana et al., 2008b). Do kultivačních pūd se k potlačení kontaminující mikroflóry přidávají antimikrobiální látky (Whittington, 2010), často ve vhodných kombinacích posilující jejich účinek např. PANTA (polymyxin B, amphotericin B, nalidixová kyselina, trimetoprim a azlocilin) nebo VAN (vankomycin, amphotericin B, nalidixová kyselina) (Slana et al., 2008b).

Pro kultivaci *MAP* se nejčastěji používají pevná a tekutá média. Z pevných pūd se zejména používá Herroldova pūda a Löwenstein Jensen, dále je vhodný i Middlebrook 7H10 a 7H11. Z tekutých pūd se používá především bujón Middlebrook 7H9 (Whittington, 2010). *MAP* nedokáže produkovat mykobaktin, což je chelatační činidlo, které váže železo a umožňuje jeho transport do buňky (Rowe a Grant, 2006), a proto musí být mykobaktin nezbytnou součástí kultivačních médií

(Whittington, 2010). Půdy obsahují i např. malachitovou zeleň, která ničí různé nečistoty a zvyšuje viditelnost kolonií. Složky jako vaječný žloutek a glycerol poskytují mastné kyseliny a další živiny potřebné pro metabolismus mykobakterií (Payeur, 2005).

Inkubace se provádí při teplotě 37 °C a za aerobních podmínek (Rowe a Grant, 2006; Slana et al., 2008b). Inkubační doba 12-20 týdnů je standardní pro tuhá média. Růst v kapalném prostředí je mnohem rychlejší a inkubace je obvykle ukončena po 8-12 týdnech (Whittington, 2010).

Pro detekci *MAP* existují i jiné a rychlejší automatické tekuté kultivační systémy. Kultivační systémy BACTEC™ 460 a BACTEC™ 12B fungují na principu detekce radioaktivního uhlíku, který je uvolňován během metabolismu mykobakterií (Payeur, 2005). Tuto metodu ovšem není možné použít ve všech laboratořích, ale existuje i další metoda založená na fluorescenční detekci. Systém BACTEC MGIT™ 960 obsahuje fluorescenční látku, která je citlivá na snižování množství kyslíku v kultivačním systému. Těmito metodami lze zkrátit dobu detekce až na 6 týdnů (Payeur, 2005).

Velikost, barva a tvar kolonií *MAP* závisí částečně na typu použitého média, kdy např. na jedné z nejčastěji používaných kultivačních půd, na Heroldově půdě, jsou kolonie drobné, drsné, malé a téměř bílé až žluté (Collins, 2003a). Výsledek kultivace je vždy třeba doplnit obarvením připravených preparátů metodou dle Ziehl-Neelsena a dále potvrdit s využitím molekulárně-genetických postupů (Payeur, 2005).

6.1.3 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je zaměřená na specifické sekvence DNA v genomu. PCR může být použita jako přímá metoda detekce *MAP* ve výkalech, tkáních, krvi a v mléce. Používá se také za účelem potvrzení výsledků bakteriální kultivace. Specificita PCR se blíží 100 % v závislosti na použité metodě. Senzitivita je nízká až 53 %. Ovšem velkou výhodou PCR je možnost získat výsledky do 24 hodin (Khol et al., 2010b; Khol a Baumgartner 2011).

Hlavní nevýhodou PCR je relativně vysoká cena. Často je také kritizována skutečnost, že obecně metody PCR odhalí nejenom živé, ale i mrtvé buňky *MAP* (Pavlík et al., 2011).

V dnešní době je více variant PCR pro detekci *MAP*. Téměř všechny ale využívají jako cíl detekce vloženou sekvenci IS900, která byla přijata jako standardní ukazatel. Bylo však zjištěno, že tato sekvence není specifická jen pro *MAP* (Slana et al., 2008b). Zkoumáním genomu *MAP* bylo nalezeno více sekvencí, které by mohly sloužit jako nové cíle pro detekci. Příkladem je gen F57, který je jedinečný právě pro *MAP* (Slana et al., 2008b; Bölske a Herthnek, 2010). Kromě zmíněných lze využívat pro diagnostiku pomocí PCR i další úseky DNA (**Tab. 2**).

Tabulka 2: Geny *MAP* využívané pro diagnostiku metodou PCR

Gen	Počet kopií v genomu
<i>IS 900</i>	15-20
<i>F 57</i>	1
<i>ISMav2</i>	3
<i>hspX</i>	1
<i>Gene 251</i>	1
<i>Gene 255</i>	1
<i>ISMAP02</i>	6

Zdroj: Bölske a Herthnek (2010)

Konvenční a nested PCR můžou způsobit falešně pozitivní výsledek, z důvodu křížové kontaminace během PCR (Bölske a Herthnek, 2010). Několik výhod oproti konvenční PCR má častěji používaná kvantitativní real time PCR (tzv. qPCR). Má vyšší citlivost, umožňuje kvantifikaci, manipulace s daty je rychlejší a jednodušší. Pro tuto metodu je ovšem lepší využít jako cíl detekce jednokopiovou sekvenci F57 než mnohokopiovou sekvenci IS900 (Slana et al., 2008a), neboť F57 je méně náchylná k falešně pozitivním výsledkům (Tasara a Stephan, 2005).

Real time PCR využívá fluorescenční sondy, nejrozšířenější je tzv. Taq-Man. Ta se váže na cílovou sekvenci. Sonda má na 5' konci fluorescenční substrát a na 3' konci tzv. zhášec, který pohlcuje fluorescenční světlo. Při zdvojování cílové sekvence je poté z 5' konce odbourán fluorescenční substrát a dochází k viditelnému záření. Výsledky jsou poté vyhodnoceny počítačem (Bölske a Herthnek, 2010).

Pro stanovení životaschopnosti *MAP* ve vzorku je možná metoda detekce mRNA, která je syntetizována pouze živými buňkami (Birmingham et al., 2008). K této detekci je vhodné využívat qPCR. Důležité je také zabránit kontaminaci s RNázami (eliminace falešně negativních výsledků) a s DNA (eliminace falešně pozitivních výsledků). Vhodnější metodou pro stanovení množství živých buněk je použití fluorescenčního barviva, které projde jen membránou mrtvé buňky a zabrání amplifikaci DNA při následné qPCR (Kralík et al., 2010). První fluorescenční barvivo popsané pro tuto metodu bylo ethidium monoazid (EMA). Ovšem toto barvivo bylo schopné proniknout i živými buňkami (Pan a Breidt, 2007; Cawthorn a Witthuhn, 2008; Kralík et al., 2010). V současnosti se využívá barvivo propidium monoazid (PMA), které je vysoce selektivní pro membrány poškozených buněk. To je s největší pravděpodobností možné vysvětlit vyšším kladným nábojem ve srovnání s barvivem EMA. Použití barviva PMA v kombinaci s F57 qPCR může být užitečné pro posouzení počtu živých buněk *MAP* (Kralík et al., 2010).

6.2 Nepřímé metody

Nepřímá diagnostika zahrnuje metody, které neprokazují přímo přítomnost *MAP* v organismu, ale pouze sledují jeho odpověď na infekci. Nejrozšířenějším přístupem je detekce protilátek jak v séru, tak v mléce pomocí testu ELISA (Pavlík et al., 2011).

6.2.1 ELISA test

Dnes existuje mnoho různých komerčních kitů ELISA (Khol a Baumgartner, 2011). Výhodou testu ELISA je nízká cena a rychlost vyšetření, které umožňuje v první fázi realizovat relativně levný monitoring ve stádě (Pavlík et al., 2011).

Senzitivita a specificita testů ELISA závisí na tom, o kterou testovací sadu se jedná. V závislosti na těchto proměnných se senzitivita pohybuje od 7 do 94 % a specificita od 41 do 100 % (Khol a Baumgartner, 2011). V klinické fázi onemocnění je citlivost vyšetření až 95 %. U zvířat klinicky zdravých, vylučujících pouze *MAP* v malém množství ve výkalech či mléce, se citlivost vyšetření pohybuje v rozmezí pouze 10 až 15 % (Pavlík et al., 2011).

Nevýhoda této metody spočívá v tom, že *MAP* je intracelulárním patogenem, s nímž primárně reaguje buněčná složka imunitní odpovědi (Pavlík et al., 2011). Dochází tedy k pozdní a variabilní protilátkové imunitní odpovědi u zvířat infikovaných *MAP*. Opožděné zvýšení hladin protilátek vede k falešně negativním výsledkům u mladých nebo nedávno infikovaných zvířat (Khol a Baumgartner, 2011). ELISA vyšetření je v podstatě schopné odhalit pouze ty jedince, u nichž je infekce *MAP* značně rozvinuta (Pavlík et al., 2011).

Tyto nepřesnosti v diagnostice vedou k neúměrnému prodlužování ozdravování infikovaných chovů, které je založené pouze na metodě ELISA (Pavlík et al., 2011).

7 Ekonomický dopad paratuberkulózy

V současnosti je paratuberkulóza považována za jedno z nejrozšířenějších a nejnákladnějších onemocnění mléčného skotu (Khol a Baumgartner, 2011).

Dobytěk s klinickými příznaky nemoci má průjem a sníženou konverzi živin. Snížená produkce mléka, neplodnost, předčasná porážka a nižší zpeněžení na jatkách kvůli špatnému stavu jatečního těla jsou hlavní ekonomické ztráty pro chovatele. Mezi hlášené ekonomické ztráty spojené se subklinickou fází patří snížená produkce mléka, snížení obsahu tuku a bílkovin v mléce, snížená porážková hmotnost, předčasná porážka a snížená plodnost. Také sem může patřit zvýšení výskytu klinické nebo subklinické mastitidy, které mohou být spojeny s infekcí *MAP*. Ztráty spojené se subklinickou fází nemoci je obtížné kvantifikovat, neboť současnými diagnostickými metodami není jednoduché tuto fázi nemoci prokázat. Z důvodu časové náročnosti bakteriální kultivace byly pro studie o dopadech subklinické fáze použity výsledky ELISA testu (McKeenna et al., 2006).

Nejčastěji se pro rozdělení ekonomických ztrát používá klasifikace přímých a nepřímých ztrát (Hasonova a Pavlik, 2006).

7.1 Přímé ztráty

- Největší ztráty jsou způsobeny smrtí klinicky nemocných zvířat anebo jejich sníženou jatečnou hodnotou.

U krav s klinickými příznaky je jatečná hodnota snížena o 20 až 30 % (McKeenna et al., 2006).

- Délka produkčního věku se u infikovaných zvířat zkracuje.

Odhadované ztráty v důsledku předčasného utracení z důvodu paratuberkulózy jsou 75 dolarů za krávu za rok (McKeenna et al., 2006). McKeenna et al. (2006) dále uvádějí, že u neinfikovaných krav byla délka produkčního věku průměrně 7,7 let. Infikované krávy bez klinických příznaků byly předčasně vyřazeny ze stáda v průměrném věku 4,9 let a krávy s klinickými příznaky byly předčasně vyřazeny přibližně ve věku 4,3 let.

- Ve stádech s výskytem *MAP* byla zaznamenána zvýšená náchylnost k jinému chronickému onemocnění (chronická artritida, ruminitida, dermatitida, mastitida, atd.).
- Snížená produkce mléka z hlediska množství a kvality, tj. změnami mléčných parametrů a zvýšením počtu somatických buněk.

U subklinicky nemocných dojnic, které byly diagnostikovány až postmortálně na základě histopatologických změn byl prokázán pokles produkce mléka o 6 % v porovnání s předchozí laktací a o 16 % ve srovnání s laktací před dvěma lety (McKeenna et al., 2006). Podobné výsledky byly zjištěny i u subklinické paratuberkulózy diagnostikované kultivací výkalů. Krávy s pozitivním výsledkem kultivačního vyšetření nadojily ve srovnání s negativními krávami ve 3. laktaci o 590 kg méně mléka a ve 4. laktaci o 1270 kg méně mléka (McKeenna et al., 2006).

- Plodnost krav ve stádě klesá vzhledem ke sníženému počtu zabřeznutí a zvýšeným poporodním komplikacím.

Za tyto ztráty jsou odpovědny především dva mechanismy, tj. negativní energetická bilance a narušení buněčné imunity (Hasonova a Pavlik, 2006).

7.2 Nepřímé ztráty

- Nerealizované budoucí výnosy od předčasně vyřazených zvířat.
- Zvýšené náklady na výrobní nečinnost.
- Zvýšené náklady na obměnu stáda (nákup mladých plemenných zvířat).
- Náklady na diagnostické testy, nebo náklady za neefektivní veterinární péči o klinicky nemocná zvířata (léčba chronického průjmu, který je obvykle fatální) a další veterinární služby.

Optimální diagnostický test musí být k dispozici za co nejnižší cenu a mít co nejvyšší přesnost. Vysoká přesnost minimalizuje počet falešně pozitivních výsledků, a tím i počet zbytečně utracených zvířat. Majitelovi totiž mohou vzniknout ekonomické ztráty vyplývající z falešně pozitivních a falešně negativních výsledků použitých diagnostických testů (Hasonova a Pavlik, 2006).

- Náklady na realizaci kontrolních programů.
- Ztráta genetické hodnoty velmi cenných zvířat, která jsou vyřazena ze stáda kvůli podezření z infekce (např. potomstva infikovaných matek).
- Náklady spojené s omezením prodeje zvířat.
- Farma, v níž se vyskytuje paratuberkulóza, může ztratit své dobré jméno.

8 Crohnova choroba

Crohnova choroba (CD) je chronické zánětlivé onemocnění střeva u lidí, které může postihnout celý zažívací trakt (Eshuis et al., 2008). Postižena může být kterákoli oblast od úst až po konečník a může se projevat i extraintestinálními příznaky (Fixa et al., 2010). Přibližně v 50 % případů se nemoc omezuje na terminální *ileum* (Eshuis et al., 2008). Již v roce 1913 bylo upozorněno na vztah mezi Crohnovou chorobou u lidí a paratuberkulózou (Fixa et al., 2010). Patologické léze střevního traktu u paratuberkulózy se výrazně podobají lézím lidského střeva u pacientů trpících Crohnovou chorobou (Pribylova et al., 2011). Stále častěji se potvrzuje izolace *MAP* u pacientů trpících Crohnovou chorobou a *MAP* se tedy možná účastní v patogenezi Crohnovy choroby (Fixa et al., 2010).

V USA je pravděpodobně 400 – 600 tisíc pacientů s CD (Economou a Pappas, 2008). Od roku 1990 do roku 2001 vzrostl v ČR výskyt CD u dětí do 15 let z 0,25 na 1,26 na 100 tisíc obyvatel (Pozler et al., 2006).

Exaktní etiologie CD je zatím neznámá (Parrish et al., 2009). Předpokládá se však, že u tohoto závažného systémového multifaktoriálního onemocnění hrají významnou roli genetické, imunologické, environmentální a bakteriální faktory (Fixa et al., 2010). Úvahu o možné účasti *MAP* v patogenezi Crohnovy choroby podporují výsledky jedné studie, v níž bylo *MAP* prokázáno v postižené tkáni 62 (58,5 %) pacientů ze 106 vyšetřených. Významně vyšší výskyt *MAP* byl prokázán z oblasti střevního postižení než z oblasti nepostiženého střeva. *MAP* byl také izolován z mléka a krve od pacientů s Crohnovou chorobou (Fixa et al., 2010).

S ohledem k nevyjasněné etiologii zůstává rovněž léčba CD velmi problematičnou. Podáváním kortikosteroidů, imunomodulačních přípravků a antibiotik lze pouze zmírnit zánět a v horších případech je zapotřebí i chirurgický zákrok (Parrish et al., 2009).

Zdrojem *MAP* pro člověka by mohlo být mléko, v němž bylo mnohokrát *MAP* prokázáno (Grant et al., 2005; Baumgartner a Khol, 2006; Slana et al., 2008b; Eltholth et al., 2009; Slaná et al., 2009; Fixa et al., 2010; Khol a Baumgartner, 2011). Dalším zdrojem by mohlo být také sušené kojenecké mléko (Hruska et al., 2011), voda (Fixa et al., 2010) nebo i maso pocházejících z nemocných zvířat (Eltholth et al., 2009).

Jiné studie zase teorii o účasti *MAP* v patogenezi Crohnovy choroby popírají (Parrish et al., 2009).

Vzhledem k vysokému a stále se zvyšujícímu výskytu paratuberkulózy u zvířat, ale i prokazovanému častému výskytu *MAP* v pasterizovaném i sušeném mléce (kojenecké dětské výživě), bude třeba studii vztahu mezi *MAP* a CD věnovat podstatně více pozornosti, než tomu bylo dosud (Fixa et al., 2010).

9 Nákazová situace paratuberkulózy

Paratuberkulóza se vyskytuje na celém světě, pouze Švédsko a některé australské státy prohlašují, že jsou prosté paratuberkulózy (Baumgartner a Khol, 2006; Khol a Baumgartner, 2011).

Prevalence infikovaných zvířat se liší podle země a regionu. Prevalence u stád mléčného skotu dosahuje v některých částech Německa až 84,7 % (Baumgartner a Khol, 2006; Khol a Baumgartner, 2011), v Dánsku 85 % (Bakker, 2010), v Nizozemsku 54 % (Tiwari et al., 2006) a v Kanadě 43 % (Khol a Baumgartner, 2011), přičemž například v kanadské provincii Ontario je jen 37 %, ale naopak v provincii Alberta dokonce 74 % (Tiwari et al., 2006). V USA bylo zjištěno 68,1 % *MAP* pozitivních stád (Khol a Baumgartner, 2011), přičemž v americkém státě Wisconsin jich bylo 50 % a ve státě Michigan 66 % (Tiwari et al., 2006). V Rakousku byly provedeny dvě reprezentativní studie, které ukázaly zvýšení séroprevalence protilátek proti *MAP* z 6,97 % pozitivních stád skotu v letech 1994-97 na 19,05 % pozitivních stád v letech 2002-2003 (Baumgartner a Khol, 2006; Khol a Baumgartner, 2011).

Do roku 1990 byla v ČR paratuberkulóza téměř neznámým onemocněním. V polovině 90. let se po importech skotu především z Dánska, Nizozemska, Německa a Francie nákazová situace výrazně zhoršila (Pavlík et al., 2011). V roce 1999 až 2001 bylo v ČR hlášeno více než 80 případů paratuberkulózy skotu. Jednalo se o stáda s bakteriologicky potvrzeným původcem. Klinické příznaky byly maximálně v polovině těchto stád. Slučováním nebo i zánikem některých stád došlo v roce 2006 k poklesu stád s prokázaným původcem na 57. Státní veterinární správa ČR (SVS ČR) provedla v roce 2007 orientační monitoring s pomocí ELISA metody v bazénových vzorcích mléka. Do sledování byla vybrána jen stáda skotu, v nichž bylo chováno více než 300 ks skotu. Vyhodnocením monitoringu bylo zjištěno, že v cca 60 % vyšetřovaných stád se vyskytovaly v mléce protilátky proti *MAP*. Doplňujícími šetřeními inspektorů krajské veterinární správy (KVS) bylo zjištěno, že klinicky se paratuberkulóza vyskytovala v méně než 0,5 % do monitoringu zařazených hospodářství (Bažant et al., 2011).

10 Prevence a tlumení paratuberkulózy

Protože paratuberkulózu je těžké diagnostikovat a nemožné léčit, je velice důležité zavádět kontrolní programy ve stádech pozitivních na *MAP* a zabránit šíření onemocnění do negativních stád (Khol a Baumgartner, 2011). Zvířata, která vylučují *MAP*, musí být ze stáda vyřazena co nejdříve, protože představují hlavní riziko šíření nových infekcí ve stádě. Zvířata pozitivní na protilátky by také měla být co nejdříve vyřazena a celé stádo by se mělo opakovaně testovat kombinací přímých a nepřímých diagnostických testů. Ze začátku se doporučuje testovat všechna zvířata starší jeden a půl roku každých šest měsíců ELISA testem a bakteriální kultivací nebo PCR. Po každém testování by opět měla být zvířata vylučující *MAP* okamžitě vyřazena a sérologicky pozitivní jedinci co nejdříve (Baumgartner a Khol, 2006; Khol a Baumgartner, 2011). Pro rychlé snížení výskytu infekce by měli být také vyřazeni všichni potomci od pozitivních krav. Jakmile se ve stádě nenacházejí už žádná zvířata vylučující *MAP*, může se testovat jednou ročně (Khol a Baumgartner, 2011).

Aby se zabránilo dalšímu šíření nemoci uvnitř *MAP* pozitivního stáda, musí být zavedena hygienická preventivní opatření. Důležité je dodržovat optimální hygienu při telení, okamžitě oddělit novorozená telata od matek. Dále by se mělo zkrmovat mlezivo pouze od krav prostých antigenů a protilátek vůči *MAP*. Mladá zvířata musí být oddělena od dospělých na pastvě po první dva roky eradikačního programu. Aby se zabránilo šíření *MAP* krmivem a vodou, může být chlévskou mrvou a močůvkou hnojena pouze orná půda. Nesmí dojít k fekálnímu znečištění vodních zdrojů. Při ošetřování mladých zvířat by mělo být používáno odlišné náradí. Zvláštní důraz by měl být kladen na důkladné čištění a dezinfekci. Důležité je také nakupovat pouze zvířata prostá *MAP* (Collins, 2004; Baumgartner a Khol, 2006; Khol a Baumgartner, 2011) Tento výše zmíněný “maximální program” proti paratuberkulóze je velmi drahý a vyžaduje velké změny v organizaci chovu a je časově náročný. Tyto nepříznivé skutečnosti často vedou k odmítání takového intenzivního programu chovateli a veterináři (Khol a Baumgartner, 2011).

Ovšem lze také použít “minimální program”, který pravděpodobně nepovede k úplné eradikaci *MAP*, ale cílem programu může být snížení počtu krav s klinickou paratuberkulózou, zabránění novým infekcím ve stádě a ochrana stád, která jsou prostá paratuberkulózou. První krok je vyřazení všech zvířat s klinickými příznaky a diagnostické posouzení každého případu průjmu u dospělého skotu za účelem vyloučení paratuberkulózy. Druhým krokem je zavedení již zmíněných hygienických opatření. Poslední krok spočívá v pravidelném hodnocení přítomnosti *MAP* ve stádě pomocí odběrů vzorků z prostředí (Khol a Baumgartner, 2011).

11 Tlumení paratuberkulózy v České republice

V ČR se začal výskyt paratuberkulózy intenzivněji sledovat až po roce 1995 v souvislosti s již zmíněnými importy skotu a s výskytem klinických příznaků nákazy v některých stádech (Bažant et al., 2011). Z těchto důvodů byl v importovaných stádech prováděn dvouletý dozor sérologickými metodami (Pavlík et al., 2011). V roce 2001 byl vydán SVS ČR Metodický návod 6/2001 k prevenci, diagnostice a zdolávání paratuberkulózy skotu. Podle něj byla při pozitivní bakteriální kultivaci na hospodářství uvalena karanténa se zákazem nákupu a prodeje zvířat (s výjimkou prodeje na jatky) a byla stanovena povinnost vybudovat hygienickou smyčku. Bakteriální kultivace výkalů se poté prováděla každých pět měsíců u zvířat starších 18 měsíců s povinností neprodleně vyřadit z chovu pozitivní jedince až do utlumení nákazy. Tento metodický návod připouštěl kromě eliminační metody i radikální metodu, kdy bylo poraženo celé stádo a do asanované farmy bylo možné po uplynutí určité doby koupit nebo přesunout nové jedince (Henyach, 2004). Zásady metodického návodu byly přísné a často kritizované zejména z řad chovatelů (Bažant et al., 2011).

Na základě stížností představitelů chovatelských svazů na postupy stanovené MN č. 6/2001 byl tento zrušen a SVS ČR vydala v roce 2008 nový metodický návod, který vznikl po konzultaci s představiteli chovatelů. Nový Metodický návod č. 5/2008 stanovující postup v prevenci šíření paratuberkulózy skotu v ČR není návodem na ozdravování od paratuberkulózy, ani návodem na její tlumení. Metodický návod č. 5/2008 respektuje, že je paratuberkulóza v ČR považována

za nebezpečnou nákazu, takže chovatel, případně soukromý veterinární lékař je povinen hlásit podezření na nákazu KVS (Bažant et al., 2011). Tento MN je založen pouze na sérologickém vyšetřování ELISA testem (Pavlík et al., 2011). MN č. 5/2008 uvádí, že pokud nebyl prokázán sérologicky pozitivní skot, KVS vydává chovateli pouze doporučení, jak dále pokračovat v ochraně stáda před zavlečením původce a jak stádo klinicky i diagnosticky sledovat. Chovatel není omezen v přemísťování zvířat. V případě pozitivního průkazu protilátek navštíví inspektor KVS dané hospodářství a posoudí, zda-li se nákaza vyskytuje ve stádě v klinické formě. Nevyskytuje-li se v hospodářství nákaza klinicky, KVS nepřijímá žádná opatření. Jsou-li ve stádě klinicky nemocná zvířata, stanoví KVS pro dané hospodářství mimořádná veterinární opatření.

V současné době tedy není v ČR žádný MN pro tlumení paratuberkulózy, neboť současný MN slouží pouze jako postup v prevenci šíření paratuberkulózy. Tento MN návod je založen pouze na sérologickém vyšetřování ELISA testem, což není úplně ideální, protože u paratuberkulózy dochází k pozdní látkové imunitní odpovědi. Další nevýhodou tohoto MN je, že SVS ČR nařizuje mimořádná opatření pouze při výskytu klinické formy onemocnění. Chovatel se tedy zbavuje pouze jedinců s klinickými příznaky, ale ve stádě stále zůstávají jedinci se subklinickými příznaky, kteří slouží jako skrytí přenašeči.

12 Certifikační program

Certifikační programy představují praktické návody, jak řešit problematiku paratuberkulózy nikoliv pouze v jednotlivých stádech, ale celoplošně. Principem je v podstatě garance stáda prostého paratuberkulózy, a tedy ochrana chovatelů, kteří kupují chovná zvířata. Zároveň by měl certifikační program poskytovat přehled o infekčním statutu jednotlivých stád jak pro chovatele, tak pro obvodní veterináře a epidemiology. Program je založen především na dobrovolné účasti chovatelů a jeho cíl je jasný, tj. dosáhnout nejlepší certifikační úrovně, tedy stáda s negativními výsledky testů, a tím si zajistit lepší ekonomickou prosperitu chovu. Lze odhadovat, že chovy prosté paratuberkulózy budou zvýhodněny při prodeji mléka a chovných,

popř. jatečných zvířat. Tyto certifikační programy jsou uplatňovány např. v Nizozemsku a v USA (Hasoňová et al., 2008).

V roce 2006 byl v Nizozemsku přijat nový dobrovolný program pro tlumení paratuberkulózy. Tento program je zaměřen na kvalitu mléka a snížení přítomnosti *MAP* v mléce dodávaného do mlékáren. Program je založen na testování mléka metodou ELISA. Podle výsledků testů je stádu s negativním ELISA testem přiřazen "statut A". Stádům, z nichž byli odstraněni pozitivní jedinci, je přidělen "statut B". Stádům, z nichž nebyla pozitivní zvířata ještě vyřazena je přidělen "statut C". Více než 80 % nizozemských mléčných stád se od zavedení připojilo k tomuto programu (Khol a Baumgartner, 2012).

13 Závěr

Původcem paratuberkulózy je *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Tato acidoalkoholrezistentní bakterie je odolná k běžným dezinfekčním prostředkům a dokáže přežívat poměrně dlouhou dobu ve vnějším prostředí. Nejvímavější k infekci jsou telata mladší 6 měsíců a k nakažení dochází nejčastěji fekálně-orální cestou. Onemocnění probíhá nejdříve subklinicky a k propuknutí klinických příznaků ve většině případů dochází ve stáří 3 – 6 let. Jelikož se paratuberkulóza neléčí, je důležité spolehlivě a především včas ji diagnostikovat. Ideální by bylo, kdyby se tuto nemoc dařilo diagnostikovat již u mladých jedinců, jenže právě u nich je diagnostika obtížná. Je tedy potřeba v budoucnu vyvinout spolehlivé diagnostické metody právě pro mladá zvířata. Dále by se v pozitivních stádech měly zavádět kontrolní programy a dodržovat různá preventivní opatření. Prvořadým cílem těchto opatření je zabránit novým infekcím především u telat.

Dnes již existují dostatečně spolehlivé programy pro tlumení nákazy. Tyto programy nejenže redukuje paratuberkulózu v postižených chovech, ale také pomáhají snižovat vstup *MAP* do řetězce výroby potravin pro lidskou spotřebu. To je důležité především z hlediska možné účasti *MAP* v patogenezi Crohnovy choroby. Studii vztahu mezi *MAP* a Crohnovou chorobou bude třeba věnovat podstatně více pozornosti, než tomu bylo dosud, neboť se stále častěji prokazuje výskyt *MAP* jak u pacientů Crohnovy choroby, tak i v pasterizovaném i sušeném mléce.

V České republice se při výskytu paratuberkulózy chovatel řídí podle Metodického návodu č. 5/2008 stanovující postup v prevenci šíření paratuberkulózy skotu v ČR. Dle mého názoru není tento metodický návod zcela ideálním, neboť se zde eliminují pouze klinické formy paratuberkulózy, přičemž subkliničtí jedinci nemoc ve stádě šíří i nadále. V ČR bylo v roce 2007 monitoringem s pomocí ELISA metody bazénových vzorků mléka zjištěno, že v cca 60 % vyšetřovaných stád se vyskytovaly v mléce protilátky proti *MAP*. Monitoring se prováděl pomocí ELISA testu a lze tedy předpokládat, že skutečná prevalence bude mnohem větší. Navíc bylo zjištěno, že klinické příznaky se zatím vyskytovaly pouze u 0,5 % pozitivních stád. Většina infikovaných jedinců ve stádě tedy byla v subklinické fázi, jenže tu současný metodický návod prakticky neřeší. Lze říci, že se dle tohoto metodického návodu

v podstatě „čeká“ na projevení se klinických příznaků, na jejichž základě je jedinec poté vyřazen. Možným celoplošným řešením by mohlo být zavedení certifikačního programu jako v mnoha jiných zemích (např. Nizozemsko, USA). Ozdravování by se tedy nechalo na dobrovolnosti chovatelů, neboť mít zdravé stádo, by přeci mělo být prioritou každého chovatele. Chovatel by navíc měl jako motivaci získání certifikátu, který by mu přinesl určité zvýhodnění (např. při prodeji mléka a chovných zvířat).

14 Seznam použité literatury

Odborné publikace

Álvarez J., de Juan L., Aranaz A., Romero B., Bezos J., Mateos A., Domínguez L.: A survey on paratuberculosis in wildlife in Spain. In: *Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis, August 14-17, 2005, Copenhagen, Denmark*. International Association for Paratuberculosis, s. 690.

Bakker D.: Paratuberculosis control measures in Europe. In: Behr M. A., Collins D. M.: *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*. Cambridge, MA: CAB International, 2010, s. 306-318. ISBN 978-1-84593-613-6.

Barkema H. W., Hesselink J. W., McKenna S. L. B., Benedictus G., Groenendaal H.: Global prevalence and economics of infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ruminants. In: Behr M. A., Collins D. M.: *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*. Cambridge, MA: CAB International, 2010, s. 10-39. ISBN 978-1-84593-613-6.

Baumgartner W., Khol J. L.: Paratuberculosis (Johne`s disease) in ruminants - an ongoing story. *Slovenian Veterinary Research*, 2006, 43 (1): 5-10.

Bažant J., Šatrán P., Semerád Z.: Paratuberkulóza skotu – koncepčnost a efektivita tlumení. In: *Paratuberkulóza skotu: Sborník referátů odborného semináře, 9. 4. 2011, Hradec Králové*. Brno: Česká buiatrická společnost, 2011, s. 16-18. ISBN 978-80-86542-26-2.

Bhatt A., Fujiwara N., Bhatt K., Gurcha S. S., Kremer L., Chen B., Chan J., Porcelli S. A., Kobayashi K., Besra G. S., Jacobs W. R.: Deletion of *kasB* in *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of acid-fastness and subclinical latent tuberculosis in immunocompetent mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104 (12): 5157–5162.

Birmingham P., Helm J. M., Manner P. A., Tuan R. S.: Simulated joint infection assessment by rapid detection of live bacteria with real-time reverse transcription Polymerase Chain Reaction. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 2008, 90 (3): 602-608.

Bolton M. W., Grooms D. L., Kaneene J. B.: Faecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in calves: implication for disease control and management. In: *Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis, August 14-17, 2005, Copenhagen, Denmark*. International Association for Paratuberculosis, s. 596-600.

Bölske G., Herthnek D.: Diagnosis of paratuberculosis by PCR. In: Behr M. A., Collins D. M.: *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*. Cambridge, MA: CAB International, 2010, s. 267-283. ISBN 978-1-84593-613-6.

Cawthorn D. M., Witthuhn R. C.: Selective PCR detection of viable *Enterobacter sakazakii* cells utilizing propidium monoazide or ethidium bromide monoazide. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, 105: 1178–1185.

Collins M. T.: Update on paratuberculosis: 1. Epidemiology of Johne's disease and the biology of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Irish Veterinary Journal*, 2003a, 56 (11): 565-574.

Collins M. T.: Update on paratuberculosis: 2. Pathology and diagnosis. *Irish Veterinary Journal*, 2003b, 56 (12): 619-623.

Collins M. T.: Update on paratuberculosis: 3. Control and zoonotic potential. *Irish Veterinary Journal*, 2004, 57 (1): 49-52.

Economou M., Pappas G.: New global MAP of Crohn's disease: genetic, environmental and socioeconomic correlations. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2008, 14 (5): 709-720.

Eltholth M. M., Marsh V. R., Van Winden S., Guitian F. J.: Contamination of food products with *Mycobacterium avium paratuberculosis*: a systematic review. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 107: 1061–1071.

Eshuis E. J., Polle S. W., Slors J. F., Hommes D. W., Sprangers M. A. G., Gouma D. J., Bemelman W. A.: Long-term surgical recurrence, morbidity, quality of life, and body image of laparoscopic-assisted vs. open ileocolic resection for Crohn's disease: a comparative study. *Diseases of the Colon & Rectum*, 2008, 51: 858-867.

Fecteau M. E., Whitlock R. H.: Paratuberculosis in cattle. In: Behr M. A., Collins D. M.: *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*. Cambridge, MA: CAB International, 2010, s. 144-156. ISBN 978-1-84593-613-6.

Fixa B., Pavlík I., Bedrna J., Komárková O., Nožička Z., Slaná I., Králík P., Vaňásek T., Volfová M.: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, etiologický faktor u Crohnovy choroby? *Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie*, 2010, 64 (2): 7–13.

Florou M., Leontides L., Kostoulas P., Billinis C., Sofia M., Kyriazakis I., Lykotrafitis F.: Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from non-ruminant wildlife living in the sheds and on the pastures of Greek sheep and goats. *Epidemiology and Infection*, 2008, 136 (5): 644–652.

Grant I. R., Williams A. G., Rowe M. T., Muir D. D.: Efficacy of various pasteurization time-temperature conditions in combination with homogenization on inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 (6): 2853–2861.

Hasonova L., Pavlik I.: Economic impact of paratuberculosis in dairy cattle herds: a review. *Veterinarni Medicina*, 2006, 51 (5): 193–211.

Hasonova L., Trcka I., Babak V., Rozsypalova Z., Pribylova R., Pavlik I.: Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissues of naturally infected cattle as affected by age. *Veterinarni Medicina*, 2009, 54 (6): 257–269.

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

Henych J.: Ozdravování skotu od paratuberkulózy. *Veterinářství*, 2004, 54: 406-414.

Hruska K., Slana I., Kralik P., Pavlik I.: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in powdered infant milk: F57 competitive real time PCR. *Veterinarni Medicina*, 2011, 56 (5): 226–230.

Chiodini R. J.: The history of paratuberculosis. In: *Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis, August 14-17, 2005, Copenhagen, Denmark*. International Association for Paratuberculosis, s. 1-4.

Judge J., Kyriazakis I., Greig A., Allcroft D. J., Hutchings M. R.: Clustering of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in rabbits and the environment: how hot is a hot spot? *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 (10): 6033–6038.

Khol J. L., Baumgartner W.: Paratuberkulóza u přežvýkavců – epidemiologie, patogeneze, diagnostika a prevence. In: *Paratuberkulóza skotu: Sborník referátů odborného semináře, 9. 4. 2011, Hradec Králové*. Brno: Česká buiatrická společnost, 2011, s. 6-12. ISBN 978-80-86542-26-2.

Khol J. L., Baumgartner W.: Examples and suggestions for the control of paratuberculosis in European cattle. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 2012, 60: 1-7

Khol J. L., Beran V., Kralik P., Trckova M., Pavlik I., Baumgartner W.: Grass silage contaminated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP): a possible source of paratuberculosis infection in ruminants? *Veterinarni Medicina*, 2010a, 55 (5): 225-232.

Khol J. L., Kralik P., Slana I., Beran V., Aurich Ch., Baumgartner W., Pavlik I.: Consecutive excretion of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in semen of a breeding bull compared to the distribution in feces, tissue and blood by IS900 and F57 quantitative real-time PCR and culture examinations. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2010b, 72 (10): 1283–1288.

Klee W.: Paratuberkulose (Johnesche Krankheit). In: Dirksen G., Gründer H. D., Stöber M.: *Innere Medizin und Chirurgie des Rindes*. Stuttgart: Parey, 2006, s. 586–591. ISBN 978-3-8304-4169-4.

Kopecna M., Trcka I., Lamka J., Moravkova M., Koubek P., Heroldova M., Mrlik V., Kralova A., Pavlik I.: The wildlife hosts of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the Czech Republic during the years 2002–2007. *Veterinarni Medicina*, 2008, 53 (8): 420–426.

Kralik P., Nocker A., Pavlik I.: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* viability determination using F57 quantitative PCR in combination with propidium monoazide treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 141: 80–86.

Li L., Bannantine J. P., Zhang Q., Amonsin A., May B. J., Alt D., Banerji N., Kanjilal S., Kapur V.: The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102 (35): 12344–12349.

Li L. L., Singh S., Bannantine J., Kanjilal S., Vivek Kapur V.: *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. In: Nene V., Kole Ch.: *Genome Mapping and Genomics in Animal-Associated Microbes*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009, s. 65–82. ISBN 978-3-540-74042-1.

Manning E. J. B., Collins M. T.: History of paratuberculosis. In: Behr M. A., Collins D. M.: *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*. Cambridge, MA: CAB International, 2010, s. 1–9. ISBN 978-1-84593-613-6.

McKeenna S. L. B., Keefe G. P., Tiwari A., VanLeeuwen J., Barkema H. W.: Johne's disease in Canada part II: disease impacts, risk factors, and control programs for dairy producers. *The Canadian Veterinary Journal*, 2006, 47 (11): 1089-1099.

Pan Y., Breidt F.: Enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells by real-time PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73: 8028–8031.

Parrish N. M., Radcliff R. P., Brey B. J., Anderson J. L., Clark D. L., Koziczkowski J. J., Ko C. G., Goldberg N. D., Brinker D. A., Carlson R. A., Dick J. D., Ellingson J. L. E.: Absence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Crohn's patients. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2009, 15 (4): 558-565.

Pavlík I., Slaná I., Kralík P., Králová A.: Výskyt původce paratuberkulózy v ČR a možnosti ozdravování infikovaných chovů přežvýkavců. In: *Paratuberkulóza skotu: Sborník referátů odborného semináře, 9. 4. 2011, Hradec Králové*. Brno: Česká buiatrická společnost, 2011, s. 13-15. ISBN 978-80-86542-26-2.

Payeur J. B.: Current culture methods for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. In: *Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis, August 14-17, 2005, Copenhagen, Denmark*. International Association for Paratuberculosis, s. 352-357.

Pozler O. et al.: Incidence of Crohn disease in the Czech Republic in the years 1990 to 2001 and assessment of pediatric population with inflammatory bowel disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 2006, 42:186–189.

Rowe M. T., Grant I. R.: *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* and its potential survival tactics. *Letters in Applied Microbiology*, 2006, 42: 305–311.

Pribylova R., Slana I, Kralik P., Kralova A, Babak V, Pavlik I.: Correlation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* counts in gastrointestinal tract, muscles of the diaphragm and the masseter of dairy cattle and potential risk for consumers. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 151: 314–318.

Slana I., Kralik P., Kralova A., Pavlik I.: 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*, 2008a,128: 250–257.

Slana I., Paolicchi F., Janstova B., Navratilova P., Pavlik I.: Detection methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and milk products: a review. *Veterinarni Medicina*, 2008b, 53 (6): 283–306.

Slaná I., Bartoš M., Roubal P., Babák V., Pavlík I.: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. a. avium* detected by culture, IS900 and IS901 highly sensitive PCR in bulk tank milk from dairy herds in the Czech Republic between 2002 and 2004. *Czech Journal of Food Sciences*, 2009, 27 (5): 372–378.

Tasara T., Stephan R.: Development of an F57 sequence-based real-time PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 (10): 5957–5968.

Tessema M. Z., Koets A. P., Rutten V. P. M. G., Gruys E.: How does *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* resist intracellular degradation? *Veterinary Quarterly*, 2001, 23 (4): 153-162.

Tiwari A., VanLeeuwen J. A., McKenna S. L. B., Keefe G. P., Barkema H. W.: Johne's disease in Canada part I: clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *The Canadian Veterinary Journal*, 2006, 47 (9): 874-882.

Weber M. F., Kogut K., de Bree J., van Schaik G.: Evidence for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* shedding in young cattle. In: *Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis, August 14-17, 2005, Copenhagen, Denmark*. International Association for Paratuberculosis, s. 680-689.

Whittington R.: Cultivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. In: Behr M. A., Collins D. M.: *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*. Cambridge, MA: CAB International, 2010, s. 244-266. ISBN 978-1-84593-613-6.

Whittington R. J., Marshall D. J., Nicholls P. J., Marsh I. B., Reddacliff L. A.: Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70 (5): 2989–3004.

Whittington R. J., Windsor P. A.: In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review and meta-analysis. *The Veterinary Journal*, 2009, 179: 60–69.

Windsor P. A., Whittington R. J.: Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. *The Veterinary Journal*, 2010, 184: 37–44.

Wiszniewska-Łaszczych A., Sztejn J., Ruszczyńska A.: A case study of the clinical form of Johne's disease in a heifer. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 2010, 34 (1): 95-99.

Woo S. R., Czuprynski Ch. J.: Tactics of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* for intracellular survival in mononuclear phagocytes. *Journal of Veterinary Science*, 2008, 9 (1): 1-8.

Legislativa

Metodický návod SVS ČR č. 5/2008, ze dne 4. března 2008, stanovující postup v prevenci šíření paratuberkulózy skotu v ČR.