

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

**Fakulta zemědělská**

**KATEDRA KVALITY ZEMĚDĚLSKÝCH PRODUKTŮ**

STUDIJNÍ PROGRAM: Zemědělství

STUDIJNÍ OBOR: Zemědělské biotechnologie

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Mykobakteriální infekce domácích a volně žijících  
přezvýkavců**

(Mycobacterial infection of domestic and wild ruminants)

Autor bakalářské práce: **Kristýna Rothová**

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

**České Budějovice 2016**

# JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta zemědělská

Akademický rok: 2015/2016

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kristýna ROTHOVÁ**  
Číslo indexu: **Z13732**  
Studijní program: **B4131 Zemědělství**  
Studijní obor: **Zemědělské biotechnologie - živočišné**  
Název tématu: **Mykobakteriální infekce domácích a volně žijících přežvýkavců**  
Zadávací katedra: **Katedra kvality zemědělských produktů**

Zásady pro vypracování:

### Úvod a cíl:

Mykobakteriální infekce, které jsou způsobovány bakteriemi rodu *Mycobacterium*, jsou u domácích i volně žijících přežvýkavců stále aktuálním tématem. Specifické vlastnosti mykobakterií, jako je vysoká odolnost ve vnějším prostředí, představují komplikace při jejich eliminaci. Mezi nejvýznamnější mykobakteriální nákazy patří paratuberkulóza, chronické onemocnění trávicího traktu s celosvětovým výskytem, a bovinní tuberkulóza, která byla z chovů skotu na našem území úspěšně eradikována. Riziko zavlečení této choroby však nesmí být, s ohledem k odlišné nakažové situaci v jiných zemích, podceňováno.

**Cílem práce** je vypracovat literární přehled zaměřený na mykobakteriální infekce, především na paratuberkulózu a tuberkulózu u zvířat volně žijících, domácích i zvířat v zoologických zahradách.

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

**Závěr:** Vyhodnocení a shrnutí získaných informací, návrhy a doporučení vyplývající ze studované problematiky.

**Abstrakt:** přehled nejdůležitějších informací – v českém a anglickém jazyce, včetně klíčových slov.

Rozsah práce – 25 - 35 stran

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

Ayele, W.Y., Macháčková, M., Pavlík, I.: The transmission and impact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants, *Veterinarni Medicina*, 2001, 46, 205-224.

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.

Khol, J.L., Beran, V., Kralik, P., Trckova, M., Pavlik, 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.

Macháčková, M., Lamka, J., Dočekal, J., Šmolík, J., Ziegrosser, P., Pavlík, I.: Bovinní tuberkulóza u spárkaté zvěře. *Veterinářství*, 2000, 50, 349-355.

Vedoucí bakalářské práce:

MVDr. Lucie Hasoňová, Ph.D.

Katedra kvality zemědělských produktů

Datum zadání bakalářské práce: 18. března 2015

Termín odevzdání bakalářské práce: 15. dubna 2016

L.S.

Prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc.

Ing. Pavel Smetana, Ph.D.

děkan

vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 18.3.2015

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci na téma „Mykobakteriální infekce domácích a volně žijících přežvýkavců“ jsem vypracovala samostatně a použila 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 22. 4. 2016

Kristýna Rothová

.....

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat především mé vedoucí bakalářské práce paní MVDr. Lucii Hasoňové, Ph.D, za odborné vedení, vlídný přístup a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům, kteří mě podporovali po celou dobu psaní bakalářské práce.

## **ABSTRAKT**

Rod *Mycobacterium*, zahrnuje velké množství zástupců, přičemž k nejvýznamnějším patří *Mycobacterium bovis*, původce tuberkulózy skotu a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) infikující dobytek, volně žijící přežvýkavce a zvířata v zoologických zahradách, což vede ke střevnímu onemocnění paratuberkulóze. Infekce má chronický průběh, je progresivní a nereaguje na léčbu. Mnoho infikovaných zvířat nejeví klinické příznaky, ale mohou být zdrojem infekce. Klinicky nemocná zvířata jsou vyhublá a trpí těžkými průjmy, které v konečném stádiu vedou k úhynu. V průběhu onemocnění je MAP vylučováno trusem nebo mlékem. Paratuberkulóza není klasifikována jako zoonóza a možná rizika v oblasti veřejného zdraví jsou stále diskutována.

Tuberkulózu skotu je onemocnění charakterizované progresivním vývojem charakteristických granulomů, v plicích, lymfatických uzlin nebo jiných orgánech. Toto onemocnění postihuje dobytek po celém světě a způsobuje velké ekonomické ztráty. Jedná se o dobře známou zoonózu, u níž rizika přenosu byla v rozvinutých zemích zmírněna díky zavedení pasterizace mléka. V České republice byla úspěšně eradikována v roce 1968, avšak riziko jejího zavlečení prostřednictvím dovozu zvířat, především do zoologických zahrad, stále trvá.

**Klíčová slova:** paratuberkulóza; bovinní tuberkulóza; *Mycobacterium*

**ABSTRACT**

The genus *Mycobacterium* is well represented by *Mycobacterium bovis*, the etiological agent of bovine tuberculosis and *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis (MAP) infects domestic cattle, wild ruminants and zoo animals leading to chronic enteritis known as paratuberculosis. The infection is chronic, progressive and unresponsive to treatment. Most infected animals do not develop clinical disease but may excrete the bacteria. Clinically sick animals suffer emaciation and in some species diarrhoea, followed by eventual death. During the course of the disease, excretion of MAP in faeces and milk occurs. Though Paratuberculosis is not classified as a zoonosis, current opinions on the possible role of this mycobacteria in public health is discussed.

Bovine tuberculosis is a disease characterised by the progressive development of characteristic granulomas, or tubercles, in the lungs, lymph nodes or other organs. This disease is a well-known zoonotic disease which affects cattle world-wide, and causes major economic losses. The public health risk has been alleviated in many countries by the introduction of pasteurisation. Bovine tuberculosis was eradicated in Czech republic in 1968, but still a risk of infection through the importation of animals mainly to the zoological gardens.

**Key words:** paratuberculosis; tuberculosis; *Mycobacterium*

## **Seznam zkratek**

*M.* – *Mycobacterium*

MAP – *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

MTB – *Mycobacterium tuberculosis*

MTC – *Mycobacterium tuberculosis* komplex

MAC – *Mycobacterium avium-intracellulare* komplex

NTM – Netuberkulózní mykobakterie

EPS – Extracelulární matrix

QS – *Quorum sensing*

MK – Mastné kyseliny

ATB – Antibiotika

ART – Acidorezistentní tyčinky

PCR – Polymerázová řetězová reakce

CFU – Kolonie tvořící jednotky

BCG – kmen *Bacillus Calmette-Guérin*



## OBSAH

1. ÚVOD A CÍL .....	10
2. MYKOBAKTERIÁLNÍ INFEKCE PŘEŽVÝKAVCŮ .....	11
2.1 Rod <i>Mycobacterium</i> .....	11
2.1.1 Charakteristika rodu <i>Mycobacterium</i> .....	11
2.1.2 Taxonomie rodu <i>Mycobacterium</i> .....	11
2.1.3 Morfologie a fyziologie mykobakterií .....	13
2.1.3.1 Formy mykobakterií deficientní v buněčné stěně .....	15
2.1.3.2 Intracelulární parazitismus mykobakterií .....	17
2.1.3.3 Mykobakteriální biofilm .....	19
2.1.4 Genom mykobakterií .....	22
2.1.5 Detekce a identifikace mykobakterií .....	23
2.1.5.1 Mikroskopický průkaz .....	24
2.1.5.1 Kultivace mykobakterií .....	25
2.1.5.3 Molekulárně-genetické metody detekce .....	27
2.2 Mykobakteriální infekce .....	28
2.2.1 Paratuberkulóza .....	29
2.2.2 Tuberkulózní infekce .....	40
2.2.2.1 Bovinní tuberkulóza .....	41
2.2.3 Mykobakteriózy .....	48
3. ZÁVĚR .....	51
4. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	53

## 1. ÚVOD A CÍL

Mykobakteriální infekce se dělí na tuberkulózní a netuberkulózní. Tuberkulózní infekce způsobují zástupci komplexu *Mycobacterium tuberculosis*, jež vyvolávají závažná plicní onemocnění lidí i zvířat. V případě přežvýkavců infekci nejčastěji způsobuje *Mycobacterium bovis*, které vyvolává onemocnění označováno jako **bovinní tuberkulóza**. Bovinní tuberkulóza je chronické bakteriální onemocnění přežvýkavců napadající nejčastěji plíce, které může být přenosné i na jiné druhy savců. Jedná o významnou zoonózu, která se na člověka přenáší typicky vdechováním aerosolů nebo požitím nepasterizovaného mléka nemocných zvířat. V České republice byla tuberkulóza skotu v roce 1968 díky rozsáhlým eliminačním postupům eradikována. Bovinní tuberkulóza se však může vyskytovat u importovaných zoo zvířat nebo u volně žijící zvěře. Z těchto důvodů je třeba provádět pravidelný monitoring formou tuberkulinace.

Netuberkulózní infekce způsobují nejčastěji zástupci komplexu *Mycobacterium avium-intracellulare*, z nichž nejvýznamnější u přežvýkavců je *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, což je obligátní patogen vyvolávající **paratuberkulózu** (Johneho chorobu). Paratuberkulóza je chronické, obtížně diagnostikovatelné, neléčitelné onemocnění střevního traktu domácích a volně žijících přežvýkavců. V dnešní době je paratuberkulóza považována za jedno z nejzávažnějších onemocnění přežvýkavců, neboť způsobuje značné ekonomické ztráty v postižených chovech.

Cílem bakalářské práce bylo vypracovat literární přehled o mykobakteriálních infekcích přežvýkavců, seznámit s nejzávažnějšími nákazami, s možnostmi přenosu, patogenezí a diagnostickými metodami. Důležité je zvážení rizik spojených s přenosem mykobakteriálních infekcí z volně žijících zvířat na zvířata v lidské péči, stejně jako ze zvířat na člověka.

## 2. MYKOBAKTERIÁLNÍ INFEKCE PŘEŽVÝKAVCŮ

### 2.1 Rod *Mycobacterium*

#### 2.1.1 Charakteristika rodu *Mycobacterium*

Rod *Mycobacterium* je širokou skupinou mikroorganismů, vyskytující se v nejrůznějších typech prostředí. (Bednář, 1996). Většina mykobakterií jsou saprofytičtí mikrobi, vyskytující se volně ve vodě nebo půdě. Existuje však řada patogenních druhů, které zahrnují jak obligátní, tak fakultativní patogeny. Někteří zástupci mykobakterií, řazeni mezi intracelulární patogeny, využívají teplokrevné živočichy, jako své hostitele (Whitman, 2012).

Tento typ patogenů se vyznačuje tím, že napadají buněčnou imunitu zvířat i lidí, čímž způsobují závažná onemocnění (Biet a kol., 2005). Schopnost přežít a množit se uvnitř hostitelských buněk je základním principem virulence mykobakterií (Macena, 2006). Faktorem virulence je toxický glykololipid (cord factor), dále také mykosidy a sulfatidy (Tremel, 2014). Vnímavý jedinec se obvykle nakazí aerogenně (dýchacími cestami), další možnosti jsou pak např. perorálně, intrauterinně, jsou popisovány i nákazy skrz infikované sperma. Uvnitř vnímavého organismu se mykobakterie šíří krevním a mízním řečištěm (Macena, 2006).

#### 2.1.2 Taxonomie rodu *Mycobacterium*

Rod *Mycobacterium* je taxonomicky řazen do čeledi *Mycobacteriaceae*, která je výše řazena do řádu *Actinomycetales* a třídy *Actinobacteria* (Tab. 1).

Tabulka 1: Taxonomické zařazení rodu *Mycobacterium*

Doména	BAKTERIE ( <i>Bacteria</i> )
Nadříše	<i>Prokaryotaea</i>
Říše	<i>Eubacteria</i>
Kmen	Aktinobakterie ( <i>Actinobacteria</i> )
Třída	<i>Actinobacteria</i>
Podtřída	<i>Actinobacteridae</i>
Řád	<i>Actinomycetales</i>
Podřád	<i>Corynebacterineae</i>
Čeleď	<i>Mycobacteriaceae</i>
Rod	<i>Mycobacterium</i>

Zdroj: Whitman (2012), modifikováno

Počet popsaných druhů mykobakterií se neustále zvyšuje. Dle záznamů uvedené databáze, bylo v roce 2010 popsáno 150 druhů, v roce 2013 se počet popsaných mykobakterií zvýšil na 167. V současné době je do rodu *Mycobacterium* řazeno 172 druhů a 13 poddruhů (k datu 10. 10. 2015 - <http://www.bacterio.net/-classificationmr.html#Mycobacterium>).

Mykobakterie lze dělit podle různých kritérií. Nejznámější dělení je na tuberkulózní a netuberkulózní (dříve atypické). Tuberkulózní mykobakterie jsou původci tuberkulózy, závažného plicního onemocnění zvířat i člověka. Do komplexu *M. tuberculosis* je řazeno několik zástupců, jako např. *M. bovis*. (**Tab. 2**); (**Biet a kol.**, 2005).

Mezi netuberkulózní mykobakterie patří všechny kromě komplexu *M. tuberculosis*. Netuberkulózní mykobakterie se dělí dle nejrůznějších hledisek. Jedno z nich je dle fenotypových vlastností, jako morfologie kolonií, produkce pigmentu, rychlost růstu atp. (**Tab. 3**) K nejvýznamnější zástupcům patří *M. avium-intracellulare* komplex (**Tab. 4**); (**Biet a kol.**, 2005).

**Tabulka 2: Zástupci komplexu *Mycobacterium tuberculosis***

	<i>Mycobacterium canettii</i>
<b><i>Mycobacterium tuberculosis</i> komplex</b>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
	<i>Mycobacterium africanum</i>
	<i>Mycobacterium microti</i>
	<i>Mycobacterium bovis</i>

Zdroj: **Biet a kol.** (2005), modifikováno

**Tabulka 3: Rozdělení netuberkulózních mykobakterií**

Skupina	Charakteristika skupiny	Hlavní zástupci
<b>FOTOCHROMOGENY</b>	Bezbarvé, při inkubaci v temnu	<i>M. kansasii</i>
	Tvorba žlutého pigmentu, při expozici na světlo	<i>M. simile</i> <i>M. marinum</i>
<b>SKOTOCHROMOGENY</b>	Barva kolonií - žlutá až oranžová	<i>M. goodii</i>
	Pigmentace i za inkubace v temnu	<i>M. szulgai</i>
<b>NON-CHROMOGENY</b>	Nepigmentované kolonie (světlo na pigmentaci nemá vliv)	<i>M. avium</i>
		<i>M. ulcerans</i>
<b>RYCHLE ROSTOUCÍ</b>	Kolonie pigmentované i nepigmentované	<i>M. fortuitum</i>
	Rychlost růstu - 5 až 7 dní	<i>M. chelonae</i> <i>M. smegmatis</i>

Vysvětlivky: *M.* – *Mycobacterium*

Zdroj: **Votava** (2003), modifikováno

**Tabulka 4: Zástupci komplexu *M. avium-intracellulare***

<b><i>M. avium-intracellulare</i> komplex</b>	<i>Mycobacterium avium</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>
		<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>
		<i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i>
		<i>M. avium</i> subsp. <i>hominisuis</i>
	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	

Vysvětlivky: *M.* – *Mycobacterium*

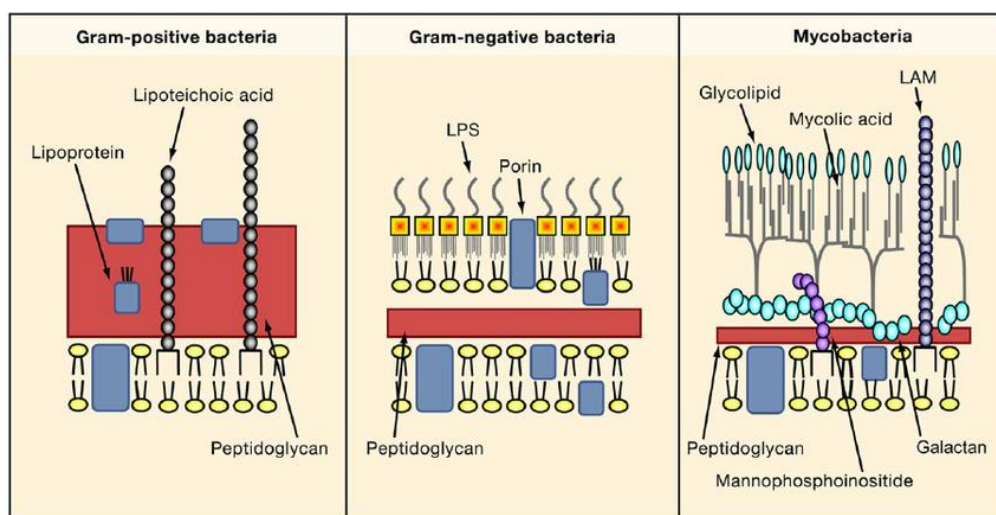
Zdroj: **Biet a kol.** (2005), modifikováno

### 2.1.3 Morfologie a fyziologie mykobakterií

Mykobakterie jsou intracelulární, aerobní až mikroaerofilní bakterie, jež jsou nepohyblivé, nesporulující a netvoří kapsule. Mají tvar rovných až mírně zahnutých tyčinek, jejichž délka se pohybuje v rozmezí od 0,2 do 10  $\mu\text{m}$  (**Kazda a kol.**, 2009).

Buněčná stěna mykobakterií má částečně odlišné chemické složení od gram-pozitivních i gram-negativních bakterií (**Obr. 1**) (**Beran a kol.**, 2006).

**Obrázek 1: Porovnání buněčné stěny bakterií**



Zdroj:

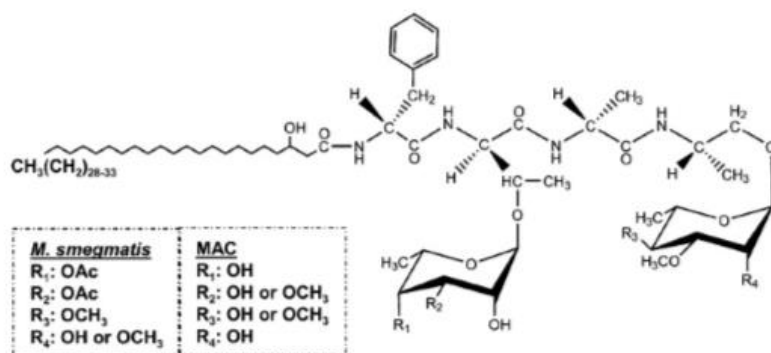
[https://www.researchgate.net/figure/7279083\\_fig1\\_Figure-1-Schematic-Representation-of-Bacterial-Cell-Walls-Gram-positive-bacteria-have-a](https://www.researchgate.net/figure/7279083_fig1_Figure-1-Schematic-Representation-of-Bacterial-Cell-Walls-Gram-positive-bacteria-have-a) (staženo 5. 2. 2016)

V buněčné stěně mykobakterií se nachází velké množství lipidů (hlavně glykolipidy – **Obr. 2**), což je příčinou acidorezistence, hydrofobicity a nepropustnosti pro hydrofilní sloučeniny (**Kazda a kol.**, 2009). Dále buněčná stěna obsahuje (**Brennan a Nikaido**, 1995):

- peptidoglykan (L-alanyl-D-isoglutaminyl-*meso*-diaminopimelyl-D-alanin)
- arabinogalaktan
- mykolové kyseliny ( $\alpha$ -mykolová, mythoxymykolová, ketomykolová)
- lipoarabinomannan
- extrahovatelné lipidy

- extrahovatelné glykolipidy
- fenolické glykolipidy
- vosky, acylované trehalosy and sulfolipidy
- glycerofosfolipidy
- proteiny

**Obrázek 2: Chemická struktura glykolipidů**



Zdroj: Schoorey a Sweet (2008), modifikováno

Hydrofobicitu umožňuje vrstva kyseliny mykolové, která je kovalentně či nekovalentně vázaná k buněčné stěně tvořené z arabinogalaktanu, který kryje peptidoglykanovou (**Macena**, 2006). Acidorezistence vede ke špatné barvitelnosti metodou dle Grama, neboť obtížně vážou organická barviva (**Votava a kol.**, 2003; **Kazda a kol.**, 2009). Ačkoliv jsou mykobakterie vzhledem k absenci vnější membrány řazeny mezi grampozitivní bakterie, díky vysokému obsahu lipidových složek jsou acidoalkoholrezistentní (**Votava a kol.**, 2003) a tedy se klasickou metodou dle Grama nebarví. Pro obarvení musí být použito speciální barvení podle Ziehl-Neelsena, při kterém se mykobakterie obarví zahřátým karbolfuchsinem a zobrazí se jako růžové až červené tyčinky na modrém pozadí (**Votava a kol.**, 2003; **Kazda a kol.**, 2009).

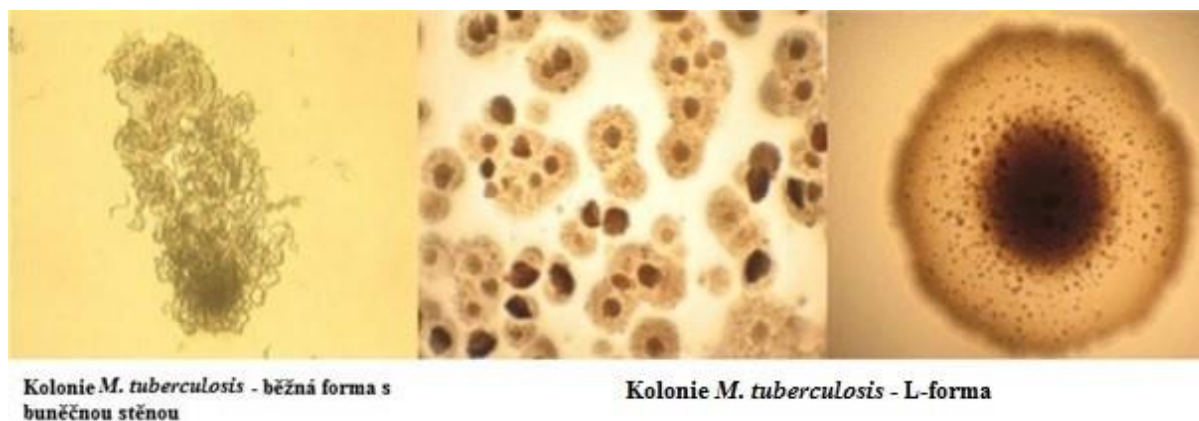
Specifická stavba buněčné stěny dává mykobakteriím vysokou odolnost vůči nepříznivým vnějším vlivům, jako jsou vysoké teploty, desinfekční prostředky, vysychání aj. Rovněž jsou velmi odolné vůči imunitnímu systému hostitele a často vykazují rezistenci vůči antibiotikům. Tyto specifické vlastnosti mykobakterií, způsobují značné komplikace, při eliminaci jimi vyvolávaných infekcí (**Beran a kol.**, 2006; **Rowe a Grant**, 2006). Mezi nejúčinnější desinfekční prostředky při likvidaci mykobakterií patří kyselina peroctová, kresoly, formalín a chlorové preparáty aktivované amonnými solemi (**Treml a kol.**, 2014). Vysoce odolná buněčná stěna mykobakterií však přináší i určitou nevýhodu spočívající v omezeném příjmu živin (**Rowe a Grant**, 2006).

### 2.1.3.1 Formy mykobakterií deficientní v buněčné stěně

**L-forma** nebo také **CWD-forma** (angl. *cell wall deficient form*) mykobakterií, je označení pro bakterie s částečnou či úplnou absencí pevné buněčné stěny, což způsobuje změny tvaru buněk, chemického složení i enzymatické aktivity. Schopnost vyskytovat a rozmnožovat se v této formě jim umožňuje přizpůsobit se nepříznivým vlivům, jako jsou škodlivé fyzikální a chemické faktory, inhibitory biosyntézy buněčné stěny (antibiotika) a hostitelské imunitní mechanismy (lysozym) (Beran, 2006; Slavchev a Markova, 2014).

L-formy byly poprvé pozorovány v roce 1945 Emmy Klieneberger-Nobelovou, která poprvé použila tento název dle Listerova institutu. Tvar kolonií L-formy byl označen “fried eggs“ (Obr. 3). Tmavý střed těchto kolonií se obvykle skládá z hustých granulí, které jsou hluboce zakotvené v médiu. Oproti tomu na okrajích kolonií se často vyskytují pleomorfní orgány. Při kultivaci na polotuhém agaru se plně vyvinuté kolonie L-formy *M. tuberculosis* začínají tvořit za 36 až 48 hodin po nanesení, což je řádově výrazně méně než při kultivaci klasických forem (Markova, 2012).

**Obrázek 3: Porovnání kolonií *Mycobacterium tuberculosis* dle přítomnosti buněčné stěny**



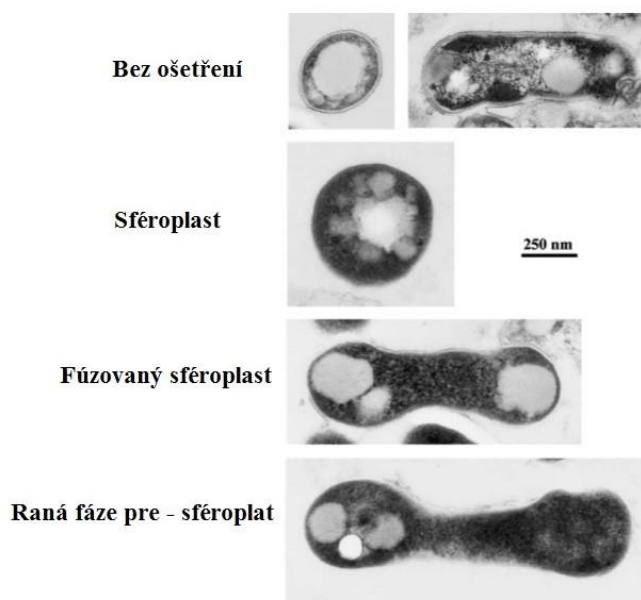
Zdroj: Markova (2012)

Obecně lze buňky deficitní v buněčné stěně rozdělit na **protoplasty a sféroplasty**. Rozdíl mezi těmito skupinami je ve stupni absence buněčné stěny. Protoplasty jsou zcela deficitní v buněčné stěně a od vnějšího prostředí jsou odděleny pouze buněčnou membránou. Často mohou být zaměňovány s mykoplazmaty, které také postrádají buněčnou stěnu (Mattman, 2001). Sféroplasty oproti tomu mají ponechanou část buněčné stěny, ale je velmi narušena, což jim umožňuje snáze propouštět látky (Cover a kol., 1991).

Hines-Styerova (2003) studie se zaměřovala na výskyt a četnost forem deficitních v buněčné stěně u *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, jehož L-forma byla zahrnuta jako možná příčina některých případů Crohnovy choroby a sarkoidózy u člověka.

Detekce těchto forem byla prováděna identifikací inzerční sekvece IS900 v kulturách z postižených tkání a to pomocí PCR a *in situ* hybridizace. Po vyhodnocení vyšetřených vzorků na elektronovém mikroskopu byla identifikována směs sféroplastů (**Obr. 4**) a dalších morfologických forem, především pre-sféroplastů (různá vývojová stadia sféroplastů), ale i fúzovaných sféroplastů a vzácně i běžných buněk s buněčnou stěnou. Na neléčených kulturách byla četnost L-forem odhadnuta pod 5 %.

**Obrázek 4: L-formy u *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis***



Zdroj: **Hines a Styer** (2003)

Morfologická variabilita je společným rysem všech L-forem bakterií, bránících se stresovým faktorům, bez ohledu na jejich druh (**Markova**, 2012). L- formy mykobakterií mohou být vysoce pleomorfní, ačkoli nejčastější jsou kulaté formy (**Beran a kol.**, 2006). Předpokládá se, že mnohotvaré formy představují různé fáze životního cyklu. Tyto formy byly u vyšetřovaných vzorků často zaměňovány za neurčité barevné artefakty nebo nečistoty (**Markova**, 2012).

Vzhledem ke své malé velikosti a pleomorficitě mohou L-formy pronikat standardními bakteriologickými filtry s velikostí pórů 220 nm (**Sweany**, 1961; **Imaeda**, 1984 - citováno **Beran a kol.**, 2006). Jedním z dalších problémů zachycení a zkoumání těchto forem je fakt, že nerostou na Lowenstein-Jensenově ani na jiných médiích, běžně používaných při diagnostice tuberkulózy (**Chandrasekhar**, 1992).

Vznik L-forem může ovlivňovat řada látek, které mají vliv na buněčnou stěnu a to zejména na biosyntézu peptidoglykanu, označované jako inhibitory buněčné stěny (antibiotika, lytické enzymy, aminokyseliny) (**Beran a kol.**, 2006; **Markova**, 2012).



Beran a kol. (2006) popsali schopnost reverze L-forem mykobakterií zpátky na acidorezistentní tyčinky, což je možné díky zachované schopnosti syntetizovat peptidoglykan a jiné makromolekulární složky buněčné stěny. Často se ukládají do sacharosy nebo do médií obsahujících různé soli s osmotickou aktivitou.

V případě *Mycobacterium bovis* je morfologická plasticita jedna ze strategií pro přežívání v nepříznivých podmínkách. Bakteriální L-cyklus (vývoj L-forem) může být považován za adaptivní reakci pro přežití ve změnách životního prostředí. Byl zde pozorován výskyt morfologických aberantních forem v různých stresových podmínkách *in vivo* i *in vitro*. Pod světelným mikroskopem byly na polotuhém médiu pozorovány dlouhá větvená vlákna a od nich odvozené další malé struktury (granule, kokobacili). Tato dlouhá vlákna pravděpodobně slouží jako hlavní obranné struktury a hrají hlavní roli v reprodukci mykobakteriálních L-forem (Slavchev a kol., 2012).

Také *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) může v makrofázích tvořit L-formy, které zvyšují jejich odolnost vůči imunitnímu systému. L-formy MTB byly nalezeny v patologických vzorcích od pacientů s tuberkulózou. Výskyt L-forem MTB má klinický význam, neboť bývá příčinou latentní, chronické a relabující infekce, což bývá hlavní příčinou perzistentní tuberkulózy. I přes úspěšné izolace od pacientů s chronickým onemocněním, přesná patogeneze L-forem MTB zůstává nejasná (Fu a kol., 2015).

### 2.1.3.2 Intracelulární parazitismus mykobakterií

Intracelulární parazitismus je schopnost mikroorganismů přežít a množit se uvnitř buněk hostitele a v případě mykobakterií bývá často označován jako nejdůležitější faktor virulence (Votava a kol., 2003), neboť jejich patogenita výrazně závisí právě na schopnosti přežít a množit se uvnitř makrofágů (García-Peréz a kol., 2003). Tuto schopnost podle všeho umožňují jedinečné složky buněčné stěny, které podporují virulenci a to buď tím, že chrání organismus před ničivými vlastnostmi hostitelských makrofágů, nebo modulují imunologické odpovědi hostitele ve prospěch patogenu (Tessema a kol., 2001).

Na rozdíl od obligátních intracelulárních parazitů (viry, chlamydie, rickettsie), které jsou zcela závislé na intracelulárním prostředí, mykobakterie mohou v hostiteli existovat jak intracelulárně, tak extracelulárně. Tato vlastnost je velmi důležitá z terapeutického hlediska, protože účinná terapie vyžaduje další úroveň přizpůsobení, která u striktně extracelulárních parazitů není nutná (Barrow a kol., 2001).

Mykobakterie vstupují do buněk imunitního systému, především makrofágů nebo polymorfonukleárních granulocytů, procesem indukované makropinocytózy. (**García-Peréz a kol.**, 2003).

Ačkoli makrofágy hrají v intracelulárním parazitismu mykobakterií klíčovou roli, tak např. MTB je schopno tvořit interakce s dalšími buňkami imunitního systému, jako jsou dendritické buňky, což zajišťuje jeho vysokou odolnost vůči imunitnímu systému hostitele. Pro dendritické buňky je charakteristické, že přijímají patogeny v místě infekce a tyto převádějí do sekundárních lymfatických orgánů (lymfatické uzliny), kde jsou posléze vystaveny T-lymfocytům (**Tailleux a kol.**, 2003). Výjimkou je *Mycobacterium leprae*, které je kromě buněk imunitního systému schopno napadat i parenchymální buňky různých orgánů (**Job a kol.**, 1989).

Makrofágy jsou cílovými buňkami intracelulárního přežívání MAP, které po namnožení způsobí lýzu buňky a do okolí se uvolňují infekční stádia, která jsou pomocí monocytů a lymfocytů odváděna do místa infekce a stávají se aktivní tím, že uvolňují celou řadu cytokinů. Stimulované makrofágy tvoří epiteloidní buňky a mnohojaderné obří buňky. Infiltrace infikované tkáně s velkým počtem zánětlivých buněk vede k zahušťování a zvlnění střešní a stěny (**Tessema a kol.**, 2001).

Aby byli intracelulární paraziti schopni přežít, vyvinuly různé metody jak uniknout imunitnímu systému hostitele. Mykobakterie zabraňují enzymatickému a toxickému ataku uvnitř makrofágů jednou ze čtyř strategií:

- únik z fagozómu do cytoplazmy
- zamezení fagosom-lysosomové fúzi
- změny obsahu lysosomálních a toxických látek
- pasivní ochrana pomocí buněčného obalu (**Tessema**, 2001)

García-Peréza a kol. (2003) se zaměřuje na intracelulární patogenitu MTB, napadající alveolární makrofágy, které představují první obrannou linii proti infekci v plicní tkáni. MTB odolává fagocytárním buňkám a jejich baktericidním mechanismům a je schopno se v nich replikovat. U MTB se také vyskytuje schopnost napadat respirační epitelové buňky. Byla prokázána přítomnost mykobakteriální DNA u několika typů plicních buněk od osob, které zemřely z jiné příčiny, než bylo onemocnění tuberkulózou. Tato DNA byla evidentní v alveolárních makrofázích, pneumocytech typu II, endoteliálních buňkách a fibroblastech, což naznačuje, že nefagocytární buňky by mohly sloužit jako potenciální rezervoár mykobakterií. Schopnost mykobakterií napadnout epitelové buňky byla nejprve pozorována

u HeLa buněk, později bylo dokázáno, že mykobakterie jsou schopné interagovat se slizničními epitelálními buňkami *in vitro* (García-Peréz a kol., 2003).

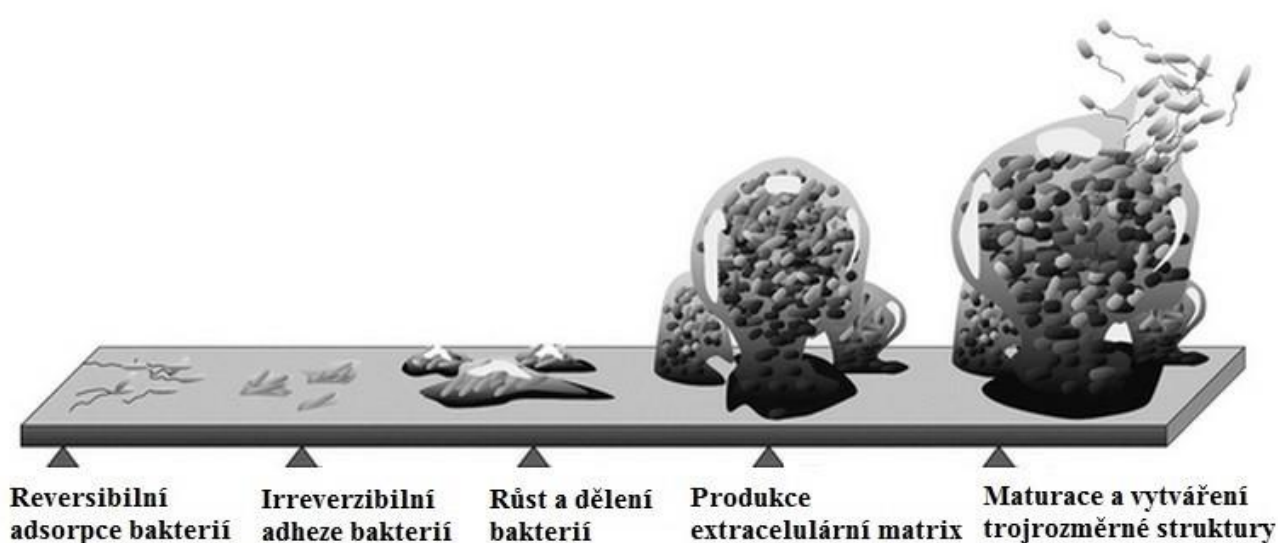
### 2.1.3.3 Mykobakteriální biofilm

Obecně je mikrobiální biofilm dynamické společenství, které se tvoří na pevném povrchu nebo na rozhraní kapaliny a vzduchu, a vytváří agregáty usazené v extracelulární matrix (Nguyen a kol., 2010). Extracelulární matrix (EPS) je složena převážně z polysacharidů, udržuje strukturu biofilmu, napomáhá jeho adhezi a chrání jednotlivé buňky před vnějším prostředím (Flemming a Wingender, 2010).

Z evolučního hlediska představuje mikrobiální biofilm adaptivní výhodu oproti planktonním formám bakterií. Napomáhá k udržování homeostázy, chrání jednotlivé buňky před fyzikálními a chemickými vlivy, zlepšuje mezibuněčnou katalytickou aktivitu a usnadňuje hromadění živin (Aparna a Yadav, 2008).

Vznik biofilmu začíná adhezí planktonických buněk povrchu, na kterém se vyskytují živiny. Adheze se uskutečňuje pomocí aktivních molekul – adhezinů, což jsou látky různých chemických povah (bílkoviny, glykopeptidy, polysacharidy). Po přilnutí k povrchu začínají buňky měnit své chování i svůj fenotyp (Shindler, 2001). Tím začíná samotné formování biofilmu, které je možné popsat v pěti základních krocích (Obr. 3, Tab. 5) (Aparna, 2008).

**Obrázek 3.: Formování biofilmu**



Zdroj: <http://www.bacteriainphotos.com/bacterial-biofilm.html> (staženo 25. 2. 2016), modifikováno

**Tabulka 5: Fáze vzniku biofilmu**

Fáze	Charakteristika	Trvání
<b>REVERSIBILNÍ ADSORPCE BAKTERIÍ</b>	Prvotní vazba bakterie k povrchu	sekundy
	Buňky se mohou z povrchu uvolňovat	
<b>IRREVERSIBILNÍ ADHEZE BAKTERIÍ</b>	Tvorba jednovrstevného biofilmu	sekundy – minuty
	Tloušťka do 10 µm	
	Začíná zhruba minutu po první fázi	
<b>RŮST A DĚLENÍ BAKTERIÍ</b>	Migrace za účelem vícevrstevné kolonie	hodiny – dny
	Tvorba buněčných agregátů	
	Snížená pohyblivost kolonie	
<b>PRODUKCE EXTRACELULÁRNÍ MATRIX</b>	Produkce exopolysacharidů (základ EPS)	hodiny – dny
	V případě mykobakterií produkce lipidů	
<b>MATURACE A VYTVÁŘENÍ TROJROZMĚRNÉ STRUKTURY</b>	Maturace (zrání) biofilmu	dny – měsíce
	Tloušťka nad 100 µm	
	Bakterie s planktonním fenotypem opouští biofilm	

Zdroj: **Aparna** (2008);

[http://biofilmbook.hypertextbookshop.com/public\\_version/contents/appendices/appendix002/pages/page004.htm](http://biofilmbook.hypertextbookshop.com/public_version/contents/appendices/appendix002/pages/page004.htm)  
modifikováno

V biofilmu probíhá řada dynamických procesů. Mezi nejvýznamnější patří *quorum sensing* (QS) a horizontální přenos DNA. QS umožňuje buňce regulovat genovou expresi na základě vnímání hustoty populace. Tuto regulaci umožňují buňce signální molekuly – autoinduktory, jejichž koncentrace je závislá na hustotě buněk v populaci. Kromě tvorby biofilmu QS reguluje i jiné fyziologické procesy, jako jsou produkce extracelulární matrix, sporulace nebo bioluminiscence (**Miller a Bassler**, 2001). Díky horizontálnímu přenosu DNA si buňky mohou předávat geny pro rezistenci (**Fux a kol.**, 2005).

Mykobakterie se od ostatních bakterií tvořících biofilm zásadně liší ve složení EPS. Hlavní složkou jejich EPS nejsou polysacharidy, ale lipidy buněčných stěn (**Zambrano a Kolter**, 2005). U některých druhů mykobakterií (*M. avium* komplex nebo *M. smegmatis*) jsou ve vnější vrstvě buněčné stěny přítomny glykopeptidolipidy (GLP). Tento druh lipidů umožňuje klouzavý pohyb, má vliv na morfologii kolonií a účastní se utváření biofilmu a to zejména v počátečních fázích adsorpce a adheze (**Schorey a Sweet**, 2008).

Ojha a kol. (2005) studie identifikovala novou skupinu mastných kyselin (MK). Tyto MK mají kratší řetězec (C56 - C68) než klasické mykolové kyseliny a za jejich biosyntézu je zodpovědný protein GroEL1, který je pro ně chaperonem. U *M. smegmatis* bylo prokázáno, že GroEL1 a celkově tyto MK mají vliv na vytváření celkové struktury biofilmu.

Oproti GLP, které mají vliv na počáteční fáze tvorby biofilmu, protein GroEL1 se uplatňuje v pozdějších fázích, zejména při maturaci (Schorey a kol., 2008; Nguyen a kol., 2010).

Nguyen (2010) ve své studii uvádí hypotézu, kdy protein GroEL1 funguje jako regulátor v syntéze kyseliny mykolové z dlouhých řetězců (C70 – C90) na deriváty s kratším řetězcem (C56 – C68). Tyto kratší deriváty byly uzpůsobeny dříve tvořit extracelulární matrix, které je zásadní pro tvorbu biofilmu.

Bylo prokázáno, že při absenci proteinu GroEL1 mykobakterie nebyly schopné vytvořit maturovaný biofilm a zároveň docházelo k chybám v produkci mykolových kyselin (Ojha a kol., 2005).

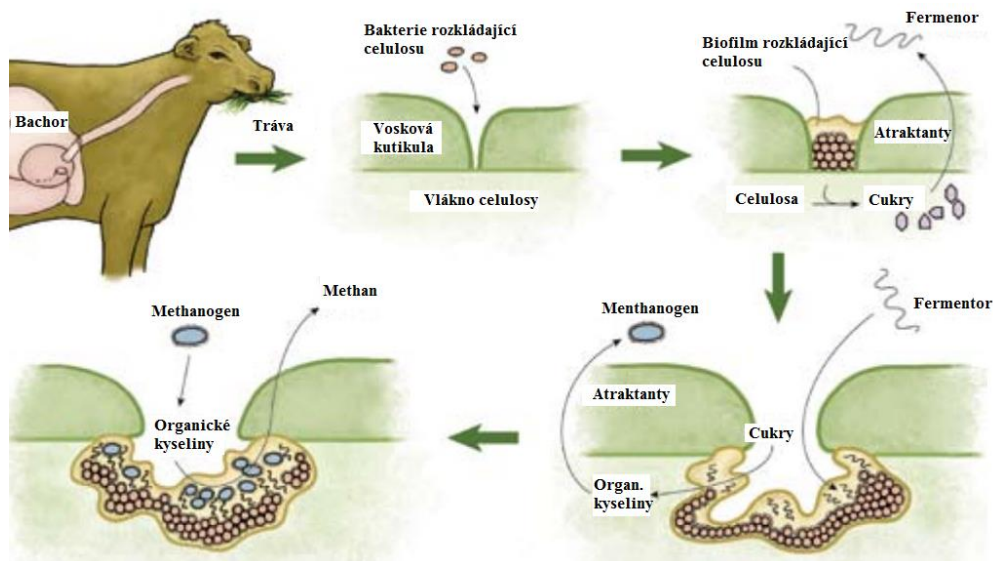
Mykobakterie ve formě biofilmu jsou mnohem více odolné vůči antimikrobiálním a dezinfekčním látkám v porovnání s jejich planktonními formami (Fux a kol., 2005). Tyto látky obtížně pronikají do spodních vrstev biofilmu, neboť extracelulární matrix vytváří nekomfortní prostředí pro rychlost transportu antibiotik (ATB), ale také pro samotné reakce buněk biofilmu s ATB (Donlan a kol., 2001). Fux a kol. (2005) ve své studii rovněž poukazuje na důležitý fakt, že v současnosti je až 60% bakteriálních infekcí způsobováno vznikem biofilmu.

Je možné, že na vzniku rezistence vůči ATB má vliv pomalý růst, neboť ATB obecně jsou účinnější v likvidaci rychle rostoucích buněk. U ATB jako jsou penicilin nebo ampicilin bylo zjištěno, že nejsou schopné likvidovat buňky nevykazující růst. S rychlostí růstu souvisí i rozmístění jednotlivých buněk v biofilmu. Buňky ve středu biofilmu mají, ve srovnání s buňkami na povrchu, výrazně menší přístup ke kyslíku a živinám, tudíž jsou více rezistentní (Harrison a kol., 2005).

Harrisonova a kol (2005) studie se taktéž zaměřuje na výskyt vícedruhového biofilmu v zažívacím traktu přežvýkavců (zejména v bachoru). Kolonie se začíná tvořit po pozření celulólytických bakterií společně s trávou (krmivem). Jednoduché mono- a disacharidy produkované těmito bakteriemi váží kvasící mikroorganismy, které přeměňují cukry na organické kyseliny. Na druhé straně, organické kyseliny přitahují metanogenní mikroby, které spojují biofilm. Organické kyseliny, nejsou neutralizovány slinami, které obvykle inhibují další růst biofilmu, ale jsou methanogeny převáděny na methan. Celý proces produkuje

mikrobiální hmotu bohatou na proteiny, která může být trávena a zvířeti poskytuje většinu živin (Obr. 4).

**Obrázek 4: Schéma působení biofilmu v bachoru přežvýkavců**



Zdroj: **Harris a kol.** (2005), modifikováno

### 2.1.4 Genom mykobakterií

Mykobakteriální genom je relativně velký (3 až 4 x 10<sup>9</sup> bp). Je charakteristický hlavně vysokým podílem guaninu a cytosinu a to 65 - 75 %. Některé druhy obsahují navíc extrachromozomální DNA, která se vyskytuje v plasmidech. Genom mykobakterií obsahuje repetitivně sekvence, nejčastěji o velikosti 5 kb (**Bednář a kol.**, 1996).

Genom MAP, konkrétně kmenu K-10 (původce paratuberkulózy u přežvýkavců), je kruhový chromosom obsahující 4 829 781 párů bází. Obsah guaninu a cytosinu je 69,3 %, což je nejvíce ze všech ostatních mykobakteriálních druhů (**Tab. 6**). Při analýze MAP bylo identifikováno více než 3 000 genů homologních s lidským patogenem MTB a 161 unikátních oblastí genomu, které kódují dosud neznámé geny MAP. Přibližně 1,5% genomu MAP tvoří repetitivní DNA, což odpovídá 72,2 kb. Dále byly popsány dva unikátní IS prvky, a to IS MAP2 přítomný v šesti kopiích a IS MAP04 přítomný ve čtyřech kopiích. Tyto unikátní sekvence mohou sloužit jako cíle pro detekci MAP, jelikož nejsou přítomny v jiných mykobakteriích (**Li a kol.**, 2005).

Komplex *M. tuberculosis* obsahuje několik poddruhů, které se vyznačují 99,9% podobností a singulárním nedostatkem genetické diverzity na úrovni nukleotidů (**Sreevatsan a kol.**, 1997). Existuje celá řada různých fenotypových znaků, které se uplatňují

pro jejich rozlišování. Tyto poddruhy, navzdory své genomové podobnosti se přizpůsobily různým hostitelů a mají velmi rozdílné stupně virulence pro člověka (**Brosch a kol., 2000**).

**Tabulka 6: Přehled hlavních znaků u vybraných zástupců rodu *Mycobacterium***

Sledovaný znak	MAP	MTB	<i>M. bovis</i>	<i>M. leprae</i>	<i>M. smegmatis</i>
Velikost genomu (bp)	4 829 781	4 411 532	4 345 492	3 988 203	6 988 209
Obsah G+C (%)	69,30	65,61	65,63	57,79	67,40
Protein kódující	91,30	90,80	90,59	49,50	92,42
Hustota genů (bp/gen)	1 112	1 114	1 091	2 037	1 013
Průměrná délka genu (bp)	1 015	1 012	995	1 011	936
tRNAs	45	45	45	45	47
rRNA	1	1	1	1	2

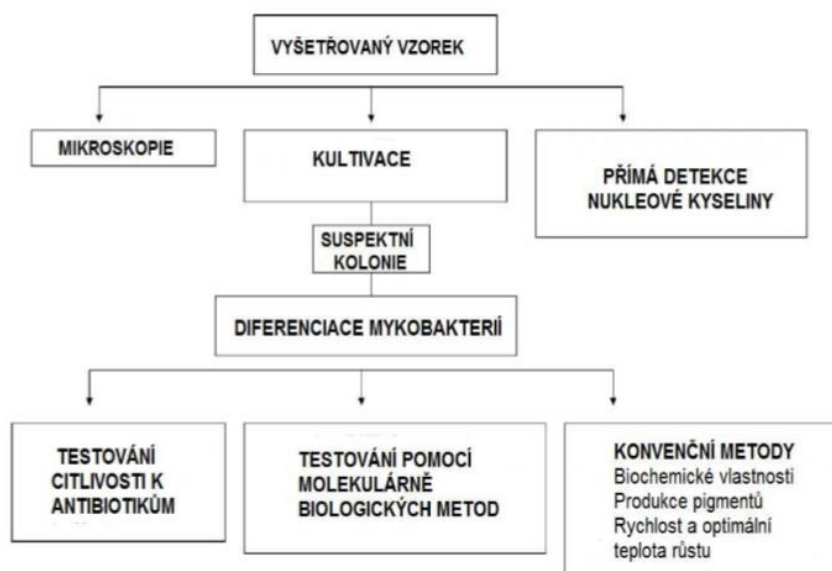
Vysvětlivky: G – guanin, C – cytosin, bp – páry bází

Zdroj: Li a kol. (2005), modifikováno

### 2.1.5 Detekce a identifikace mykobakterií

Mykobakterie jsou původci závažných onemocnění lidí i zvířat, proto je rychlá a přesná identifikace na úrovni druhu nezbytná pro stanovení diagnózy a následný výběr adekvátní léčby. Detekce a identifikace vychází z několika základních kroků (**Obr. 5**). V první řadě jsou to standardní mikrobiologické postupy, jako je kultivace a mikroskopie, po nichž následuje identifikace suspektních kolonií pomocí molekulárně biologických metod (**Tab. 7**) (**Neonakis a kol., 2008**).

**Obrázek 5: Postup při vyšetřování vzorků**



Zdroj: Neonaks a kol. (2008)

**Tabulka 7: Laboratorní metody pro diagnostiku tuberkulózy a mykobakterií**

Laboratorní metoda	Doba do získání výsledku	Hodnocení – průkaz
<b>Mikroskopie</b>	2 hodiny	acidorezistentní tyčinky
<b>Kultivace</b>	2 – 9 týdnů	živé mykobakterie
<b>Urychlená kultivace</b>	několik dnů až 6 týdnů	živé mykobakterie
<b>PCR</b>	6 – 8 hodin	genetický materiál specifický pro <i>M. tuberculosis</i> komplex

Vysvětlivky: *M.* – *Mycobacterium*, PCR – polymerázová řetězová reakce  
Zdroj: Ptáková (2011), modifikováno

#### 2.1.5.1 Mikroskopický průkaz

Mikroskopický průkaz je základní metodou pro detekci acidorezistentních bakterií ve vyšetřovaném vzorku. Poskytuje rychlé informace o morfologii, velikosti a uspořádání bakterií. Při tomto typu vyšetření chybí možnost podrobnější identifikace a určení životaschopnosti (Bednář a kol., 1996). Mikroskopie vykazuje až stokrát nižší citlivostí než kultivace (Votava a kol., 2003).

Pro průkaz acidorezistentních mikroorganismů se nejčastěji používá barvení dle Ziehl-Neelsena. Acidorezistentní tyčinky jsou obtížně barvitelné, ale pokud barvivo přijmou, zachovávají si ho i při odbarvování silnými kyselinami nebo alkoholy. Preparát se barví za tepla karbolfuchsinem, následně se odbarvuje kyselým alkoholem a kontrastně se dobarvuje metylenovou modří nebo malachitovou zelení (Votava a kol., 2003).

K průkazu mykobakterií se využívá také fluorescenční mikroskopie, která disponuje vysokou citlivostí. Mezi běžně používané fluorochromy patří např. fluorescein, rodamin, auramin nebo akridinová oranž (Votava a kol., 2003).

Obarvený preparát je pozorován pod imerzním objektivem při zvětšení 10x100. Při barvení dle Ziehl-Neelsena se meandrovitě vyšetřuje 50 zorných polí. Oproti tomu při fluorescenčním barvení pouze 25. Celkový výsledek se hodnotí pomocí křížků (Tab. 8) (Bednář a kol., 1996).



**Tabulka 8: Hodnocení výskytu acidorezistentních tyčinek mikroskopickým vyšetřením**

Označení	Barvení dle Ziehl-Neelsena	Fluorescenční barvení
<b>0</b>	ART nenalezeny	ART nenalezeny (nebo 1 – 4)
<b>Přesný počet</b>	ojedinělý výskyt ART (do 9 ART v preparátu)	neuvádí se
<b>+</b>	10 – 20 ART	ojedinělý výskyt ART (5 - 20)
<b>++</b>	21 – 100 ART	početný výskyt ART (21 - 100)
<b>+++</b>	více než 100 ART	velmi početný výskyt ART (více než 100)

Vysvětlivky: **ART** – acidorezistentní tyčinky, hodnocení v 50 (Ziehl-Neelsen) a ve 25 (fluorescenční barvení) zorných polích

Zdroj: Čermák a kol. (2014)

### 2.1.5.1 Kultivace mykobakterií

Oproti ostatním mikroorganismům je růst mykobakterií extrémně pomalý. Dokonce i u nejrychleji rostoucích mykobakterií probíhá kultivace v řádech dnů až týdnů. Podle rychlosti růstu se dají mykobakterie dělit na pomalu rostoucí a rychle rostoucí (**Tab. 9**) (**Kazda a kol.**, 2009). Saprophytické druhy se obvykle řadí mezi rychle rostoucí, s kultivační dobou do sedmi dnů. K pomalu rostoucím, s kultivační dobou v řádech týdnů až měsíců, je řazena většina patogenních druhů (**Trembl a kol.**, 2014).

Kultivace je považována za klíčovou metodu detekce kultivovatelných mykobakterií. V porovnání s mikroskopií je citlivost kultivace mnohem vyšší, jelikož teoreticky umožňuje pomnožení všech životaschopných mykobakteriálních buněk do velikosti makrokolonie (**Bednář a kol.**, 1996).

**Tabulka 9: Rozdělení mykobakterií dle rychlosti růstu na kultivačních půdách**

Skupina mykobakterií	Generační doba	Kultivační doba	Příklad zástupce
<b>Rychle rostoucí</b>	Obvykle do 24 hodin	2-7 dnů	<i>M. fortuitum</i>
<b>Pomalou rostoucí</b>	15-30 hodin	(2) 3-6 (9) týdnů	<i>M. avium</i>
<b>Nerostoucí <i>in vitro</i></b>	10-20 dní	-	<i>M. leprae</i>

Zdroj: Whitman (2012), modifikováno

Kultivační metody jsou finančně nenáročné a mají poměrně dobrou specificitu. Oproti tomu mezi jejich nevýhody patří právě extrémní časová náročnost a nižší citlivost (**Reddacliff a kol.**, 2003).

Na růst mykobakterií má vliv jak pH, tak teplota. I přes svůj pomalý růst, je jejich metabolismus srovnatelný s jinými mikroorganismy. Pomalý růst mykobakterií je pro ně výhodný, a to zejména při změnách vnějšího prostředí, kdy jim dává dostatek času pro přizpůsobení, což jim umožňuje přežít (**Kazda a kol.**, 2009).

Každé kultivaci musí předcházet **dekontaminace** vyšetřovaného biologického materiálu, a to z důvodu přerůstání pomalu rostoucích mykobakterií rychle rostoucími bakteriemi nebo plísněmi. Při dekontaminaci však dochází ke snižování počtu životaschopných mykobakterií, a to až o 90 % (**Bednář a kol.**, 1996).

Existuje celá řada dekontaminačních technik. Jednou z nejpoužívanějších je tzv. **HCl/NaOH dekontaminační metoda**, která využívá působení kyseliny chlorovodíkové s následnou neutralizací chloridem sodným. Tato metoda vychází ze schopnosti mykobakterií odolávat nízkému pH, zatímco drtivá většina ostatních bakterií a plísní je usmrcena (**Fischer a kol.**, 2000).

Dekontaminační metody jsou často voleny podle typu vzorku. Pro dekontaminaci vzorků trusu se často využívá cetylpyridinium chlorid, což je detergent organického původu (**Glanemann a kol.**, 2004), a to nejčastěji v koncentraci 0,75 % (**Grant a kol.**, 2003). Pro tento typ vzorku je dále možno použít hexadecylpyridinium chlorid v koncentraci 0,9 %. Hexadecylpyridinium chlorid se také používá pro dekontaminaci tkání, ale v nižší koncentraci 0,75 % (**Reddacliff a kol.**, 2003).

Po dekontaminaci následuje centrifugace, která na základě rozdílných koncentrací mikrobů vytvoří sediment. Vzniklý sediment se poté naočkuje na kultivační médium (**Bednář a kol.**, 1996).

Pro kultivaci mykobakterií se používají jak pevná, tak tekutá kultivační média. Mezi pevná kultivační média jsou řazeny vaječné půdy (např. Löwensteinova – Jensenova nebo Ogawova) často s přídavkem škrobu, glycerolu a aminokyselin, dále Herroldovo médium s přídavkem vaječného žloutku a média agarová (Middlebrook M7H10 a M7H11). Tekutá kultivační média jsou např. Šulova nebo Banišova půda a Middlebrook M7H9 (**Tsukamura**, 1990; **Votava a kol.**, 2003; **Treml a kol.**, 2014).

Vyhodnocení kultivace se provádí v pravidelných intervalech. Nejprve po prvním týdnu kultivace z důvodu vyloučení kontaminovaných vzorků rychle rostoucími bakteriemi. Poté se vzorky obvykle odečítají ve čtrnáctidenních intervalech. Po třech týdnech se typicky

objevují zejména tuberkulózní mykobakterie. U suspektních kolonií se hodnotí velikost, vzhled a pigmentace. Vyšetření se obvykle ukončuje po devíti týdnech (**Bednář a kol.**, 1996; **Votava a kol.**, 2003).

### 2.1.5.3 Molekulárně-genetické metody detekce

Podstatou molekulárně-genetických metod je identifikace mikroorganismu na základě jeho genetické informace (určení sekvence nukleových kyselin). Tyto metody poskytují přímý průkaz mykobakterií v biologickém materiálu. Vyznačují se přesnou identifikací, a to až na úrovni poddruhu (**Slaná a kol.**, 2010).

Základní používanou metodou je **polymerázová řetězová reakce (PCR)**, která umožňuje selektivní amplifikaci konzervativní sekvence genomu mykobakterií. Poté může být amplifikovaný úsek hybridizován se sondami. Tyto sondy jsou vysoce specifické sekvence primerů vždy pro určitý mykobakteriální druh. Výhodami metody PCR je vysoká specifita, citlivost, rychlost, dobrá rozlišovací schopnost a možnost automatizace. Mezi nevýhody PCR patří nepřesnost v replikaci, nutnost znalosti sekvencí, které ohraničují amplifikovaný úsek a neschopnost rozlišit živé buňky od mrtvých. Konečným produktem PCR jsou amplikony, které jsou detekovány na agarózovém gelu nebo měřením množství produktů v reálném čase. (**Kočárek**, 2007; **Neonakis a kol.**, 2008).

Pro přímý průkaz mykobakterií je vhodná metoda **real-time PCR**, která umožňuje měření nárůstu koncentrace amplifikovaného produktu v průběhu PCR, což slouží ke kvantifikaci syntetizovaného produktu. Kvantifikace amplikonu se provádí prostřednictvím fluorescenčního signálu barviva, jehož hodnota odráží přímou úměrou množství nasyntetizované DNA (**Šmarda a kol.**, 2005). Tato metoda umožňuje identifikaci a zároveň kvantifikaci mykobakteriálních druhů bez předchozí kultivace (**Neonakis a kol.**, 2008).

Mezi další způsoby identifikace mykobakterií je řazena analýza jednotlivých genů, které jsou typické pouze pro rod *Mycobacterium* (**Tab. 10**). Nejznámějším z nich je gen pro **16S rRNA**, což je vysoce polymorfní a druhově specifická oblast DNA (**Wilton a Cousins**, 1992).

**Tabulka 10: Zástupci genů specifických pro mykobakterie**

Gen	Funkce genu	Zdroj
<i>hsp65</i>	kóduje protein tepelného šoku	<b>Ringuet a kol., 1999</b>
	umožňuje od sebe odlišit zástupce komplexu	<b>Adékambi a kol., 2003</b>
<i>rpoB</i>	<i>M. tuberculosis</i> od netuberkulózních mykobakterií (kóduje beta podjednotku RNA polymerázy)	
<i>dnaJ</i>	kóduje stresový protein DnaJ	<b>Takewaki a kol., 1994</b>
<i>IS900</i>	identifikace MAP (14 - 18 kopií)	<b>Bull a kol., 2003</b>

Poměrně novou metodou pro identifikaci mykobakterií je **MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie**, při níž dochází k analýze hmotnostního profilu molekul strukturálních bílkovin 16S podjednotky mikrobiálních ribozomů. Bílkoviny tvořící ribozomy jsou druhově specifické. Změřené bílkovinné spektrum testovaného kmene je srovnáno s databází referenčních druhů. Výhodou této metody je rychlost, jelikož výsledku je reálně dosaženo během několika minut (**Čermák a kol., 2014**).

Metody prokazující přítomnost samotného původce jako je PCR, jsou přímé, proti tomu metody prokazující odpověď organismu na setkání s původcem (produkci protilátek) např. **ELISA**, jsou metody nepřímé. (**Gilardoni a kol., 2012**).

ELISA (enzym-linked immunosorbent-assay) vychází z imunochemické reakce, ve které spolu reaguje antigen a protilátka vyskytující se v krvi nebo mléce. Nejčastěji se tato metoda využívá pro detekci MAP (**Gilardoni a kol., 2012**). Na základě ELISA výsledků lze prokázat, zdali se daný jedinec setkal s patogenem. Výhoda této metody je její, cena, rychlost a možnost automatizace. Mezi nevýhody patří proměnná citlivost, což může být dáno faktem, že tvorba protilátek nastává až v terminální fázi onemocnění, kdy citlivost vyšetření dosahuje až 95 %, oproti tomu citlivost vyšetření klinicky zdravého zvířete vykazuje hodnoty pouze do 15 % (**Salgado a kol., 2007; Pavlík a kol., 2011a**).

## 2.2 Mykobakteriální infekce

Mykobakteriální infekce se dělí na tuberkulózní a netuberkulózní. Tuberkulózní infekce způsobují zástupci komplexu *Mycobacterium tuberculosis* (MTC). Jedná se o závažná plicní onemocnění lidí i zvířat, které u přežvýkavců nejčastěji způsobuje *Mycobacterium bovis* (MB), a je označováno jako **bovinní tuberkulóza** (**Biet a kol., 2005**).

Netuberkulózní infekce způsobují nejčastěji zástupci komplexu *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAC), z nichž nejvýznamnější u přežvýkavců je *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, což je obligátní patogen vyvolávající **paratuberkulózu** (Biet a kol., 2005).

Mezi netuberkulózní jsou řazeny také podmíněně patogenní mykobakterie, které jsou převážně saprofytické, ale za určitých podmínek jsou schopny vyvolat onemocnění lidí i zvířat, označované jako **mykobakteriízy** (Votava a kol., 2003).

### 2.2.1 Paratuberkulóza

Paratuberkulóza (Johneho choroba) je chronické, obtížně diagnostikovatelné, neléčitelné onemocnění postihující střevní trakt domácích a volně žijících přežvýkavců, jejímž původcem je *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Obr. 7). V dnešní době je paratuberkulóza považována za jedno z nejzávažnějších onemocnění přežvýkavců, neboť způsobuje značné ekonomické ztráty v postižených chovech (Khol a Baumgartner, 2011).

#### Obrázek 7: MAP v elektronovém mikroskopu



Zdroj: Slaná a Dziedzinská (2015)

#### Historie paratuberkulózy

Paratuberkulózu poprvé popsali v roce 1895 doktoři Heinrich Albert Johne a Langdon Frothingham, kteří prokázali přítomnost acidorezistentních tyčinek ve střevě infikované uhynulé krávy, která trpěla střevním onemocněním. Tyto tyčinky jsou nerozlišitelné od původců tuberkulózy, tudíž prvním závěrem bylo, že se jedná o atypickou formu tuberkulózy, která byla označena jako „*pseudotuberculous enteritis*“ (Manning a Collins, 2010; Khol a Baumgartner, 2011).

V roce 1906 veterinář Bernhard Bang prokázal, že se nejedná o tuberkulózu a označil toto onemocnění jako paratuberkulózu tj. připomínající tuberkulózu. Též v tomto roce vznikl název Johneova choroba (Manning a Collins, 2010).

Na území České republiky byl výskyt MAP poprvé laboratorně prokázán v roce 1962 u jedné importované dánské červinky (**Hasoňová a kol.**, 2006). U volně žijících zvířat byl poprvé zaznamenán výskyt paratuberkulózy v roce 1975, a to u oborně chovaného bílého jelena lesního. Ve volné přírodě byl zjištěn výskyt paratuberkulózy v roce 1995 u jelena lesního. V tomto případě bych prokázán kontakt s importovanými zvířaty, u kterých se diagnostikovala paratuberkulóza stejného genotypu (**Pavlík**, 2011b).

### **Legislativa**

Stanovisko Evropské komise označuje paratuberkulózu jako nákazu, která nezpůsobuje chovatelům velké ekonomické ztráty. Rovněž není brána jako zoonóza, tudíž se pro neschvalují ozdravovací programy k eliminaci onemocnění. Zatímco v Evropské unii (EU) je povinnost hlásit jen klinicky nemocná zvířata, aby se zamezilo obchodování s infikovanými zvířaty, podle legislativy České republiky je zavedena oznamovací povinnost již při podezření na výskyt paratuberkulózy, a to Krajské veterinární správě. Paratuberkulóza je v ČR zařazena do přílohy č. 2 veterinárního zákona, tzn. je považována za nebezpečnou nákazu (**Bažant a kol.**, 2011; **Slaná a kol.**, 2016). Pokud epizootologické vyšetření prokáže nákazu, vyhlášují se mimořádná veterinární opatření, které může být zrušeno nejdříve za rok po vyřazení klinicky nemocného zvířete, a to jen v případě že se neobjeví další (**Slaná a kol.**, 2016).

### **Etiologie paratuberkulózy**

Původce paratuberkulózy *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* je nejpomaleji rostoucí ze všech kultivovaných mykobakterií. Běžná doba kultivace MAP u skotu je až 3 měsíce (**Obr. 8**) a u malých přežvýkavců i více než 6 měsíců (**Hasoňová a kol.**, 2008). Byly popsány izoláty MAP z ovcí, jejichž kultivační doba překročila jeden rok (**Kopečná a kol.**, 2008).

### **Obrázek 8: MAP po 3 měsících inkubace při 37°C na pevné půdě dle Herrolda**



Zdroj: **Pavlík** (2011b)

Rovněž i odolnost MAP vůči vnějšímu prostředí je extrémní ve srovnání s ostatními. Ve vodním prostředí dokáže přetrvávat více než 48 týdnů a v půdě téměř rok (Hasoňová a kol., 2008). Oproti tomu Slaná a Kovařík (2014) uvádějí schopnost přežívání v říční vodě je zhruba 38 týdnů. Dále uvádějí, že MAP dokáže přežít v prostředí až 36 týdnů, v trusu zvířat 44 týdnů, v dobře skladované kejdě 55 týdnů, a při teplotě -14°C minimálně rok (Slaná a Kovařík, 2014). MAP se řadí mezi nejobtížněji eliminovatelné i proto, že odolává teplotám běžné pasterizace (72 - 73°C) po dobu několika desítek sekund (Hasoňová a kol., 2008). MAP je vysoce odolné vůči desinfekčním prostředkům (včetně chlorovaných preparátů) a UV záření. Zásadní je rovněž rezistence MAP vůči antibiotikům, tudíž infikovaná zvířata nejsou léčena (Slaná a kol., 2016).

Charakteristickou vlastností MAP je neschopnost syntetizovat mykobaktin (chelatační činidlo), které je nezbytné pro vázání železa a jeho transport do buňky (Pavlík a kol., 1999).

### Způsoby přenosu nákazy

Nejčastější cestou nakažení MAP je **fekálně-orální přenos** což znamená, že prostředí kontaminované infikovanými výkaly slouží jako zdroj nákazy pro vnímavé jedince. Tímto způsobem může dojít k přenosu z volně žijících zvířat, která kontaminují pastviny, na hospodářská zvířata (Kopečná a kol., 2008). Studie Kopečné a kol. (2008) testovala volně žijící přežvýkavce na přítomnost MAP (Tab. 11). Testování prokázalo, že průměrně 2,2 % lesní zvěře v ČR, je pozitivní na paratuberkulózu.

**Tabulka 11: Výsledky testování volně žijících přežvýkavců na území ČR (2002 – 2007)**

Volně žijící přežvýkavec	Počet vyšetřených	Počet pozitivních	%
Jelen lesní	2 296	12	0,5
Srnec obecný	835	2	0,2
Daněk skvrnitý	1 381	78	5,7
Muflon asijský	866	28	3,2

Zdroj: Kopečná a kol. (2008), modifikováno

Nejnáchylnější k infekci způsobenou MAP jsou telata (mláďata), avšak klinické příznaky se dostávají až ve věku i několika let. Existuje několik možností nákazy telat (Windsor a Whittington, 2010). První možností je požití MAP kolostrem nebo mlékem. Z tohoto důvodu je nutné v infikovaném chovu krmit telata pouze mlezivem od vlastní matky

nebo sušenými náhražkami. Typickým způsobem nakažení telat je pro ně typické olizování předmětů, proto by měla být od narození chována odděleně od starších kusů. (Hasoňová a kol., 2008).

Další cestou možností je nitroděložní přenos z matky na mládě. Bylo prokázáno, že přibližně 25 % telat, u kterých se projeví klinické příznaky paratuberkulózy bylo infikováno právě již *in utero* (Khol a Baumgartner, 2011).

Ve volné přírodě mohou být zdrojem infekce rozkládající se těla uhynulých, infikovaných jedinců (Obr. 9) (Pavlík, 2011b).

### Obrázek 9: Rozkládající se tělo uhynulého muflona



Zdroj: Pavlík (2011b), Foto: J. Lamka

Jednou z další možných cest šíření MAP se ukázaly výsledné produkty bioplynových stanic (fugát, separáty), které ideálně bývají používány jako hnojivo. Mezi dva hlavní vstupy do bioplynových stanic patří rostlinná složka a živočišný odpad, který představuje možnou cestu zavlečení MAP. Řada chovů využívá separát jako podestýlku, či dokonce ke zkrmování, čímž může docházet k reinfekci nebo dokonce k infikování zdravých chovů (Slaná a Dziedzinská, 2015)

### Patogeneze

Hlavní cestou vstupu MAP do hostitele je trávicí trakt, především sliznice ilea (Obr. 10) a korespondující mízní uzliny (Khol a Baumgartner, 2011). V batoru, se MAP aktivuje a postupuje do dolní části trávicího traktu. Jakmile se MAP dostane do ilea, kde skrze Peyerovy plaky vstupuje do M buněk střeva, odkud je dále přenášeno do makrofágů. (Arsenault a kol., 2014; Viale a kol., 2014).

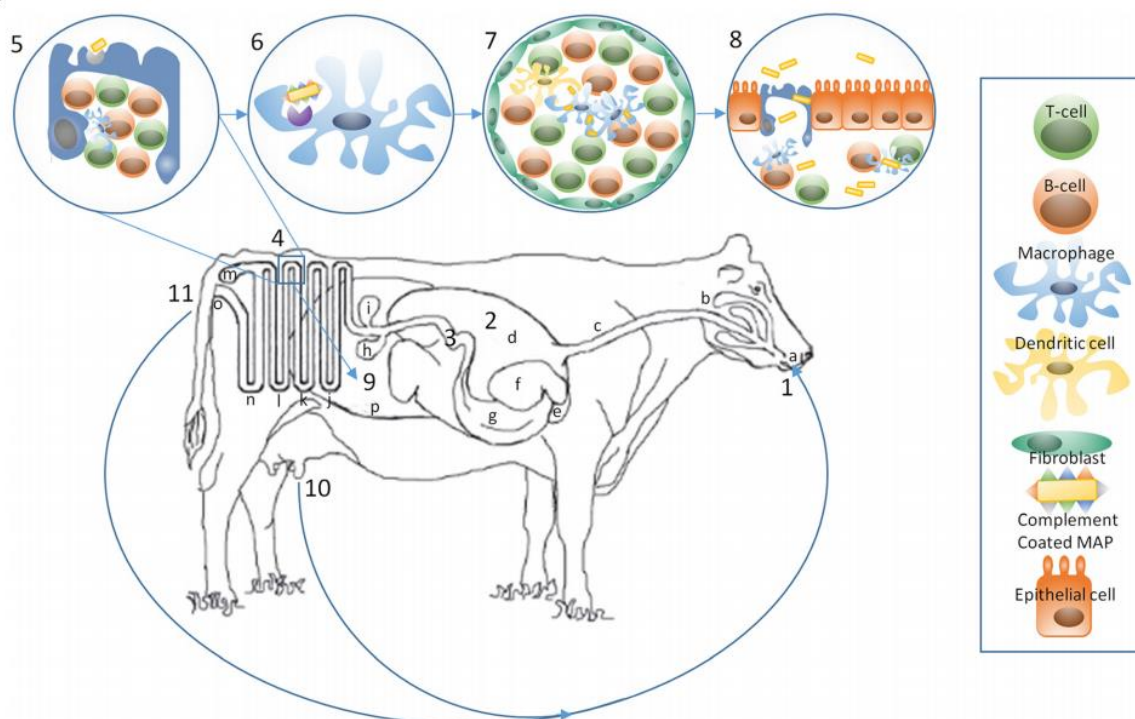


MAP obsahuje bílkovinu fibronectin, která tvoří vazbu s bílkovinou M-buněk integrinem. Vznik této vazby umožňuje vstup mykobakterií do M buněk. Takto vzniklý komplex je následně fagocytován makrofágem. (Woo a Czuprynski, 2008).

Infikované makrofágy tvoří granulomy, které mohou být zdrojem latentní infekce MAP (Arsenault a kol., 2014). Uvnitř makrofágů může MAP migrovat do mezenterálních uzlin a skrze *ductus thoracicus* do krevního řečiště odtud pak dochází k šíření MAP do celého těla (Baumgartner a Khol, 2006).

Pokud makrofágy s fagocytovaným MAP, které je schopno se uvnitř makrofágu množit, prostoupí do podslizniční vrstvy, kde se hromadí, způsobí její zesílení. Tento stav má za následek sníženou absorpci především proteinů, chronický průjem a další klinické příznaky (Manning a Collins, 2001).

**Obrázek 10: Schéma postupu infekce MAP gastrointestinálním traktem**

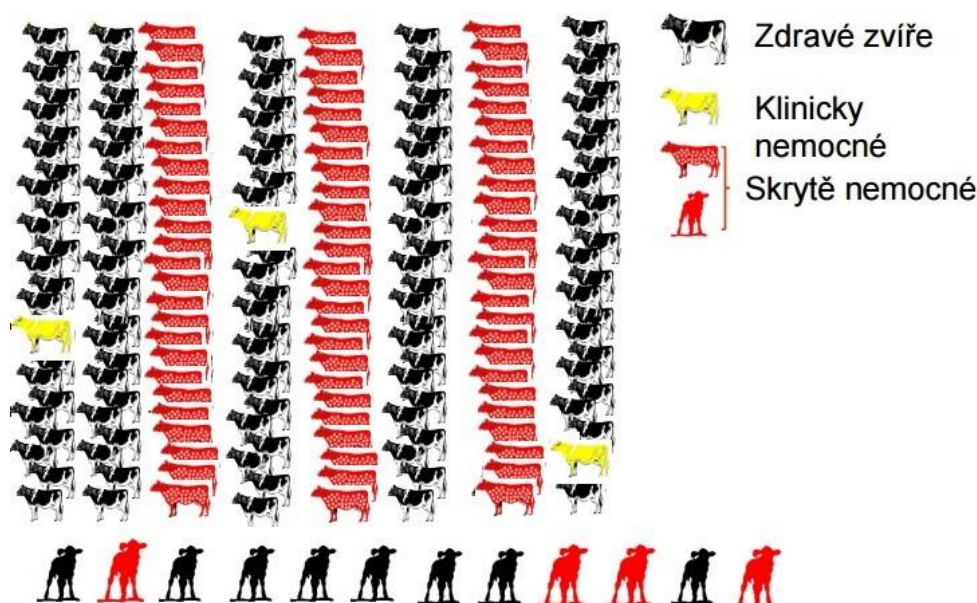


Zdroj: Arsenault a kol. (2014)

### Klinické projevy

Paratuberkulóza je onemocnění, které lze pomocí klinických příznaků identifikovat jen ve velmi malé míře, neboť v infikovaném stáde je klinicky nemocných většinou jen několik jedinců (Obr. 11). Infekce MAP se dělí do čtyř fází (Tab. 12), a to v závislosti na závažnosti klinických příznaků, potenciálu šíření nákazy a možnostech detekce (Tiwari a kol., 2006). Rychlost vývoje klinického onemocnění po infekci ovlivňují faktory, jako je špatná výživa, souběžné parazitická, virová a bakteriální infekce, nebo stres (St-Jean a Jeringan, 1991).

Obrázek 11: Příklad výskytu paratuberkulózy ve stádě



Zdroj: [http://www.opbcunkov.cz/dokumenty/prednaska/Cunkov\\_PAB\\_17\\_2\\_014.pdf](http://www.opbcunkov.cz/dokumenty/prednaska/Cunkov_PAB_17_2_014.pdf)  
(staženo 12. 2. 2016)

Tabulka 12: Přehled fází paratuberkulózy skotu

Fáze	Klinické projevy	MAP ve vyloučeném trusu (CFU/g)	Pravděpodobnost detekce
Tichá infekce	<b>X</b>	nejsou vylučovány	<b>(d)</b>
		Slabě < 10	
Subklinická	<b>X</b>	Mírně 10 – 50 Hojně > 50	<b>+d</b>
Klinická	úbytek hmotnosti, snížení dojivosti, nepravidelný průjem stále trvající průjem,	<b>+</b>	<b>+d</b>
Pokročilá	letargie, vysoký úbytek váhy	<b>+</b>	<b>+d</b>

Vysvětlivky: **x** – bez klinických projevů, **+** – MAP vylučovány trusem, **(d)** – vzácně detekovatelné, **+d** – detekovatelné

Zdroj: Gilardoni a kol. (2012)

V infikovaném stádě připadají na jedno zvíře s pokročilou klinickou paratuberkulózou 1-2 zvířata s klinickou formou onemocnění, 6 až 8 skrytých přenašečů se subklinickou formou a 12-25 jedinců s tichou infekcí MAP (Fecteau a Whitlock, 2010).

První fází je tzv. „**tichá infekce**“, do níž obvykle spadají mladá zvířata, v případě skotu do dvou let věku, zatímco volně žijící druhy do 8 až 12 měsíců věku (**Manning a kol.**, 1998; **Tiwari a kol.**, 2006). Tato zvířata nevykazují žádné klinické příznaky a rovněž nejsou k dispozici žádné měřitelné hodnoty subklinické nákazy. Tichá infekce se tak stává nedetekovatelnou, neboť neexistují nákladově efektivní diagnostické testy (**Tiwari a kol.**, 2006).

Druhá fáze je označována jako subklinická. Zvíře stále nevykazuje klinické příznaky, nicméně je již možné MAP detekovat pomocí běžných laboratorních metod (**Tiwari a kol.**, 2006).

Klinická fáze infekce vychází ze skutečnosti, že MAP způsobuje chronické zánětlivé změny střevní sliznice (**Obr. 12**), snižující vstřebávání živin (**Hasoňová a kol.**, 2008). Počáteční klinické příznaky přicházejí po dlouhé inkubační době 3 až 5 let, v závislosti na úrovni expozice a schopnosti zvířete bojovat proti infekci (**Ayele a kol.**, 2001; **Tiwari a kol.**, 2006). První signálem je postupný úbytek na váze, i přes normální nebo, občas zvýšené chuti k jídlu. V konečném efektu dochází k chronickým průjmům, který nejsou citlivé na léčbu, a hubnutí (**Tiwari a kol.**, 2006; **Hasoňová a kol.**, 2008). U skotu se dále projevuje otok v krku a otok břicha, ztráta barvy srsti, vyhublost, která může končit eventuální smrtí (**Ayele a kol.**, 2001). Nejvíce rizikovou skupinou skotu bývají vysokoprodukční dojnice. U masných plemen skotu v našich podmínkách byl pozorován úbytek živé hmotnosti zvířat o 100 až 300 kg, a to v rámci několika týdnů (**Hasoňová a kol.**, 2008).

**Obrázek 12: Změny stěny střevní během paratuberkulózy**



Zdroj: [https://lookfordiagnosis.com/mesh\\_info.php?term=paratuberculosis&lang=1](https://lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=paratuberculosis&lang=1)  
(staženo 29. 3.2016)

U ovcí, koz (**Obr. 13**), velbloudovitých a jelenů se klinické projevy dostavují dříve než u skotu. U ovcí a koz je primárním klinickým projevem paratuberkulózy chronické hubnutí a jen 10 – 20 % případů je postiženo klinickým průjmem nebo shlukováním výkalů v pokročilém stádiu onemocnění (**Tiwari a kol.**, 2006).

**Obrázek 13: Koza v klinickém stádiu paratuberkulózy**



Zdroj: <http://www.paratuberculosis.net/johnes.php> (staženo 29. 3. 2016)

Podobné klinické příznaky vykazují i volně žijící přežvýkavci, ale akutní paratuberkulóza je často pozorována u mladé zvěře, která většinou podléhá onemocnění do dvou týdnů (**Ayele a kol.**, 2001). Další rizikovou skupinou jsou trofejová zvířata, u nichž nastupuje stadium úplné vyhublosti poměrně rychle (**Hasoňová a kol.**, 2008).

Vzhledem k silné dehydrataci se zvyšuje příjem vody a současně snižuje produkce mléka. Nicméně, chuť u zvířat a vitální funkce (srdeční frekvence, dechová frekvence, teplota) zůstávají normální (**Tiwari a kol.**, 2006). Tiwari dále uvádí, že většina infikovaných zvířat je vyřazena již v subklinické fázi z důvodu snížené produktivity, a k rozvoji klinických příznaků tudíž dochází pouze u 10 až 15 %. (**Tiwari a kol.**, 2006).

Pokud zvíře není vyřazeno v klinické fázi je letargické, slabé a vyhublé. V důsledku silných průjmů se dostavuje hypoproteinémie projevující se typicky submandibulárním edémem (tzv. bottle jaw) (**Tiwari a kol.**, 2006).

### **Nákazová situace ČR**

Paratuberkulóza byla do roku 1990 téměř neznámým onemocněním vyskytujícím se vzácně v některých chovech ovcí a skotu. V polovině 90. let se nákazová situace výrazně změnila, a to především z důvodů importů skotu z tehdejších států EU. V této době se stále častěji začaly objevovat klinické případy chronického průjmu a hubnutí, což vedlo k odhalení

desítek infikovaných stád skotu. Od roku 1990 byla snaha tlumit paratuberkulózu jak u mléčného, tak masného a dojeného skotu, u jelenů lesních, daňků, muflonů, antilop a dalších druhů přežvýkavců. (Pavlík a kol., 2011a).

Po provedeném monitoringu v roce 2007 s kapacitním hospodářstvím s chovem skotu, byl výskyt infikovaných zvířat odhadován až v 70 % hospodářstvích (Kolektiv autorů, 2008).

V roce 2013 byla potvrzena celkem dvě ohniska paratuberkulózy. První z nich v Plzeňském kraji, kde bylo vyhlášeno ohnisko na hospodářství skotu na základě pozitivního kultivačního vyšetření orgánů odebraných na jatkách. Druhé ohnisko bylo vyhlášeno v ZOO v Ústí nad Labem, kde byla nákaza potvrzena bakteriologicky u uhynulé laně jelena bělohubého. V ZOO byla vyhlášena mimořádná veterinární opatření, nicméně klinická forma paratuberkulózy nebyla mezi přežvýkavci v ZOO zjištěna (Kolektiv autorů, 2014).

Za období od 1. 1. 2005 do konce roku 2014 byl výskyt paratuberkulózy potvrzen celkem ve 28 chovech. Z uvedeného počtu ohnisek nákazy bylo k 31. 12. 2014 devět stále aktivních, dodržujících mimořádná veterinární opatření, z čehož 6 ohnisek se nachází v Jihočeském kraji a pět z nich patří jednomu chovateli (Kolektiv autorů, 2015).

## **Prevence a tlumení**

Paratuberkulóza je těžce diagnostikovatelné a neléčitelné onemocnění, je tudíž velice důležité zavádět kontrolní programy ve stádech pozitivních na MAP a zabránit šíření onemocnění do negativních stád (Khol a Baumgartner, 2011).

Před přijmutím vhodných opatření k tlumení paratuberkulózy je nutno definovat nálezový status (Tab. 13) (Slaná a Kovařík, 2014).

Obecně je v rámci tlumení paratuberkulózy snaha co nejvíce omezit možnost infekce vnímavých jedinců, a to hlavně mláďat (Slaná a Kovařík, 2014). Je důležité rychlé oddělení mláďete od matky. Názory na tento proces se různí, ideálně by však mělo být tele oddělené okamžitě, nejpozději však do 12 hodin po porodu. Je však třeba zvážit nejen hledisko etologické, ale v první řadě včasné napojení mláďete mlezivem, které je pro mláďata přežvýkavců nezbytné pro získání protilátek proti infekčním agens z prostředí (Hasoňová a kol., 2008).

**Tabulka 13: Rozdělení chovů dle výsledků ELISA**

Chov	Sérologicky pozitivní zvířata	Způsob identifikace
Vysoké promoření	nad 12 %	jednoduché sérologické vyšetřením bazénového vzorku mléka
Střední promoření	6 – 12 %	vyšetřením vzorků z použitých mléčných filtrů, PCR, bazénové vzorky mléka jsou sérologicky negativní
Nízké promoření	do 6 %	screeningové vyšetření individuálních vzorků mléka, vyšetření mléčných filtrů a bazénových vzorků mléka jsou negativní
Certifikovaný	chovy dlouhodobě negativní nebo se sporadickým výskytem pozitivních zvířat	-

Vysvětlivky: PCR – polymerázová řetězová reakce

Zdroj: **Slaná a Kovařík** (2014)

Pokud se nákaza v chovu prokáže, je nezbytně nutné přijmout následující zootechnická opatření týkající se zejména okolo porodního období:

- nutná separace porodních boxů pro telení pozitivních a negativních krav
- přemístění telat z porodního boxu v co nejkratší době
- telata prvotetek napájet výhradně kolostrem vlastních matek
- při získávání kolostra se vyvarovat kontaminace trusem
- jalovičky napájet nejlépe prověřeným sušeným mlékem s certifikátem
- telata odchovávat mimo stáje pro krávy (a výkrmny)
- v chovu je nutno maximálně snížit stresové zatížení, vyvarovat se chyb ve výživě, nenakupovat zvířata z neproověřených zdrojů.
- je vhodné vést evidenci, zda tele nepochází od pozitivní matky a původ kolostra, pokud není od vlastní matky (**Slaná a Kovařík**, 2014).

K výživě mláďat v pozitivních chovech lze ke krmení využít mlezivo od vlastní matky nebo náhradní, zamražené mlezivo od prověřených neinfikovaných matek. Směsné mléko, určené pro mláďata, by mělo být vždy tepelně ošetřeno, a to 20 minut při 80 °C. Nejspolehlivější variantou mléčné výživy bez rizika kontaminace MAP jsou sušené mléčné náhražky (**Hasoňová a kol.**, 2008).

Zvířata vylučující MAP v jakékoli fázi onemocnění, musejí být vyřazena ze stáda co nejdříve, jelikož představují hlavní zdroj šíření infekce ve stádě. Zvířata pozitivní na

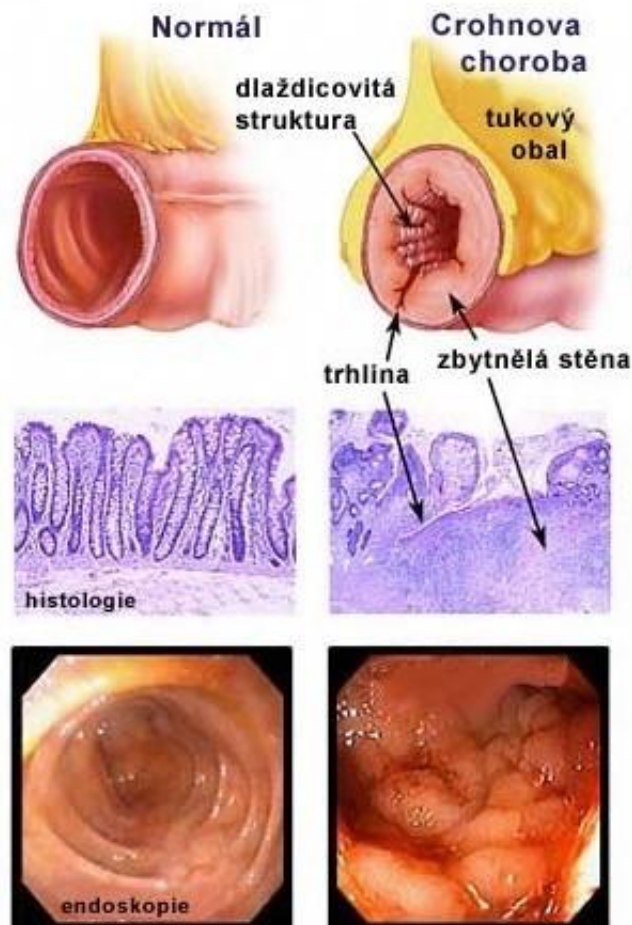
protilátky by také měla být co nejdříve vyřazena a celé stádo opakovaně testováno kombinací přímých a nepřímých diagnostických testů (Khol a Baumgartner, 2011).

### Crohnova choroba

Crohnova choroba je chronické zánětlivé lidské onemocnění střeva (Obr. 14), které může postihnout celý zažívací trakt, v 50 % případů se však omezuje na terminální část ilea (Eshuis a kol., 2008). Svým průběhem se velmi podobá paratuberkulóze. U pacientů postižených Crohnovou chorobou bylo MAP detekováno častěji, než u lidí zdravých, nicméně není známo, jestli se u nich nejprve projevila nemoc a poté byli infikováni MAP, nebo naopak. Kauzální souvislost mezi MAP a Crohnou chorobou nebyla prozatím prokázána, ale MAP je uváděno jako jedna z možností (Cirone a kol., 2007).

Člověk se může MAP nakazit prostřednictvím konzumace kontaminovaného mléka, mléčných produktů nebo masa, a to především díky odolnosti MAP vůči teplotám běžné pasterizace (Cirone a kol., 2007).

Obrázek 14: Porovnání zdravé a infikované střevní sliznice



Zdroj: <http://bartlova-szs.wz.cz/crohnovachoroba4.html> (staženo 28. 3. 2016)

## 2.2.2 Tuberkulózní infekce

Tuberkulózní infekce jsou zoonotická onemocnění způsobena zástupci komplexu *Mycobacterium tuberculosis* (MTC), která představují skutečný problém v populacích zvířat po celém světě. Většina zástupců MTC je schopna infikovat volně žijící druhy i zvířata chovaná v lidské péči, a to jak hospodářská, tak zoo zvířata (**Tab. 11**) (Alvarez a kol., 2010; Lécu a Ball, 2011).

**Tabulka 14: Zástupci MTC a jejich hostitelé chovaní v lidské péči**

Zástupce MTC	Hlavní známí hostitelé	Hostitelé chovaní v lidské péči
<i>M. tuberculosis</i>	člověk, lidoopi	sloni lidoopi kozy ptáci tapír jihoamerický žirafy nosorožci
<i>M. bovis</i>	dobytek (buvol, bizon)	všichni přežvýkavci psovití hlodavci lidoopi velké kočkovité šelmy divoká prasata sloni nosorožci koně ptáci onager velbloudovití
<i>M. caprae</i>	ovce, koza, prase	(divoká) prasata jeleni jelenec běloocasý velbloudi bizoni
<i>M. microti</i>	hraboši, velbloudovití	divocí osli velké kočkovité šelmy
<i>M. pinnipedii</i>	Ploutvonožci	velbloudi tapíři velké kočkovité šelmy
<i>M. africanum</i>	Člověk	dobytek prasata lidoopi

Vysvětlivky: *M.* – *Mycobacterium*, MTC – *Mycobacterium tuberculosis* komplex  
Zdroj: Lécu a Ball (2011), modifikováno



### 2.2.2.1 Bovinní tuberkulóza

Bovinní tuberkulóza je chronické bakteriální onemocnění přežvýkavců napadající nejčastěji plíce, které může být přenosné i jiné druhy savců. Rovněž se jedná o významnou zoonózu, která se na člověka přenáší typicky vdechováním aerosolů nebo požitím nepasterizovaného mléka nemocných zvířat. Původcem bovine tuberkulózy je nejčastěji *Mycobacterium bovis* a v menší míře *Mycobacterium caprae* (Alvarez a kol., 2010).

#### Nákazová situace

V minulosti byla bovine tuberkulóza běžnou příčinou tuberkulózy lidí, kteří se nakazili nejčastěji infikovaným nepasterovaným mlékem. V ČR byla tuberkulóza skotu v roce 1968 díky rozsáhlým eliminačním postupům eliminována (Pavlas, 2008). Po vstupu ČR do EU byla rozhodnutím Komise č. 320/2004 ze dne 31. března 2004 prohlášena za oficiálně prostou tuberkulózu pokud jde o stáda skotu. Pro udržení uvedeného statusu je však nutné dle platné legislativy provádět pravidelný monitoring (Tab. 15) (Kolektiv autorů, 2014).

**Tabulka 15: Souhrnný monitoring tuberkulózy skotu z roku 2014 v ČR**

Rok	Zvířata I	Pozitivní	Zvířata II	Pozitivní	Dubiózní	PA změny na jatkách	Kult. pozitivní
2010	5 162	0	-	-	-	2	0
2011	6 338	0	-	-	-	5	0
2012	6 560	0	-	-	-	0	0
2013	7 151	0	-	-	-	1	0
2014	7 362	0	169 171	5	18	0	0

Vysvětlivky: Zvířata I - Počet vyšetřených plemenných býčků, býků a zvířat z jiných členských států, Zvířata II – Počet vyšetřených krav (dojnic) starších 24 měsíců jednoduchou tuberkulinací, PA – Patologické, Kult.– Kultivačně  
Zdroj: Kolektiv autorů (2014)

V současné době největší riziko opětovného zavlečení bovine tuberkulózy představuje dovoz infikovaných zvířat do zoologických zahrad a jiných zájmových chovů. Nákaza se pak může přenést na jiná zvířata či na ošetřovatele, kteří se následně mohou stát potenciálním zdrojem infekce. K přenosu v tomto případě dochází nejčastěji inhalací, přenos přímým kontaktem nebyl prokázán (Bártů a kol., 2009).

Byly zaznamenány konkrétní případy importů zoo zvířat pozitivních na boviní tuberkulózu, a to např. u bizonů v roce 1993 nebo u tapírů v roce 1994 (**Pavlík a kol.**, 2011b).

Tuberkulóza způsobena původcem *M. caprae* byla na území ČR prokázána v posledních třech ohniscích boviní tuberkulózy, a to v roce 1995 u skotu, v roce 1999 u farmově chovaných jelenů lesních a v roce 2002 u velbloudů dvouhrbých v ZOO Praha (**Pavlík a kol.**, 1995).

V letech 1990 - 2004 byl v šesti státech střední Evropy (Česká republika, Chorvatsko, Maďarsko, Polsko, Slovensko a Slovinsko) monitorován výskyt boviní tuberkulózy u skotu, ostatních hospodářských a volně žijících zvířat. Celkem byla prokázána v 1270 farmách skotu a 115 ostatních druhů zvířat (**Tab. 16**).

**Tabulka 16: Vyhodnocení pozitivních zvířat dle způsobu chovu**

Místo chovu zvířete	Počet pozitivních	%
Volná příroda	55	47,8
Zoologické zahrady	38	33,0
Infikované farmy skotu	18	15,6
Farmy jelenů lesních	2	1,8
Obory	1	0,9
Cirkusy	1	0,9

Zdroj: **Pavlík a Trčka** (2006)

Bovinní tuberkulóza u zvířat v zoologických zahradách rozhodně není zanedbatelná, neboť byla prokázána celkem u 38 zvířat spadajících do 13 živočišných druhů. V zoologických zahradách jsou zvířata chována ve velkých koncentracích, což vede k riziku přenosu nejen pro vlastní stádo, ale i pro ostatní chovaná zvířata. Proto je nutné důsledně dodržovat zdravotní zkoušky před přesuny zvířat a laboratorní došetřování na mykobakteriální infekce všech uhynulých zvířat (**Pavlík a Trčka**, 2006).

### **Etiologie boviní tuberkulózy**

Původcem boviní tuberkulózy je *Mycobacterium bovis*, což je obligátní interacelulární patogen (**Pollock a Neill**, 2002). Patogenita tuberkulózních bacilů spočívá v jejich schopnosti přežít v hostiteli po dlouhou dobu, kde vyvolává onemocnění překonáním imunitního systému (**Flynn a Chan**, 2001).

Schopnost přežívat dlouhou dobu mimo tělo hostitele, je způsobena nepropustností mykobakteriální buněčné stěny a pomalým růstem. Ve srovnání s MAP je však *M. bovis* méně odolné a více citlivé na změny pH (Pollock a Neill, 2002). *M. bovis* je schopno v kadáveru přežívat 5 – 6 měsíců, v hnoji a na pastvině až 5 měsíců a ve stájích až 10 měsíců. Pokud je však *M. bovis* vystaveno přímému slunečnímu svitu, je zničeno za několik minut (Pavlík a kol., 2011b).

Kultivace *M. bovis* vyžaduje 37 °C, ale na rozdíl od *M. tuberculosis*, které kolonie začíná tvořit zhruba po dvou týdnech, rostou jeho kolonie delší dobu, a to v rozmezí mezi 6 - 9 týdny. Kolonie jsou drobné, bezbarvé, hladké a ploché (Bednář a kol., 1996).

### Způsoby přenosu nákazy

Zdrojem bovinní tuberkulózy je nejčastěji nemocné zvíře vylučující *M. bovis* v pokročilém stádiu infekce sekrety, exkreta a exkrementy, které nejčastěji mají podobu sputa, výkalů nebo mléka. V menší míře může být infekce přenášena děložními exkreta, močí nebo semenem (Macháčková a kol., 2004).

Nejčastějším typem přenosu *M. bovis* (Obr. 15) je inhalace aerosolů, tedy aerogenní přenos. Alternativní aerogenní možností nákazy je vdechnutí kontaminovaných prachových částic a kapek, říhání, nebo z pastvin kontaminovaných výkaly volně žijících infekčních zvířat (Phillips a kol., 2003).

Další možnost přenosu je alimentární cestou, a to přímo pozřením patogenu nebo ve zpracovaných výrobcích (Macháčková a kol., 2004).

Je možný také průnik skrze poraněnou kůži. Více možností přenosu umožňuje šíření nákazy mezi jednotlivými druhy zvířat (Macháčková a kol., 2004).

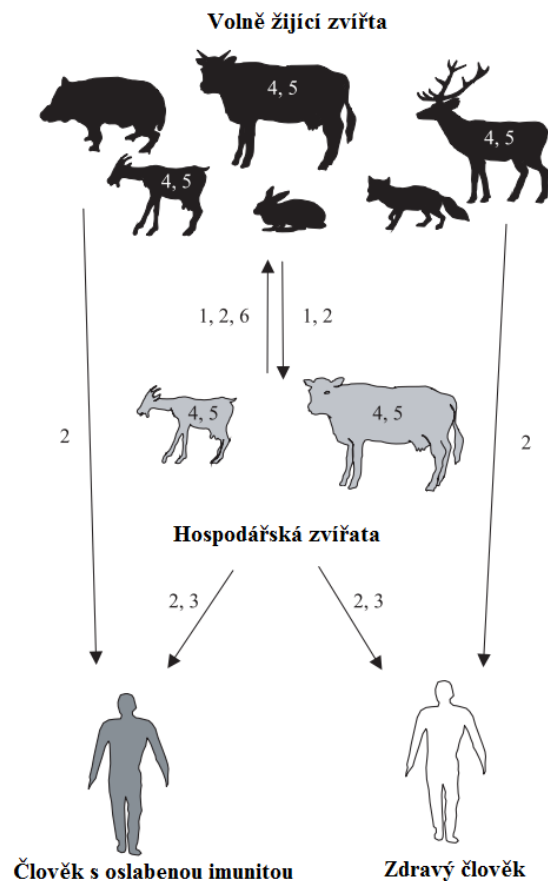
Přenosové cesty mezi zvířaty jsou přímo spojeny s lokalizací granulomů. Plicní léze obecně vedou k vzdušnému přenosu, zatímco léze mezenterických lymfatických uzlin mohou vést k vylučování mykobakterií ve výkalech. Horizontální přenos je nejrozšířenější způsob kontaminace. K vertikálnímu přenosu může docházet přes placentu či pupečnickovou infekci (Kaneene a Pfeiffer, 2006).

Volně žijící přežvýkavci jsou v porovnání se skotem vnímavější k bovinní tuberkulóze, jelikož se u nich během tuberkulózního procesu ve velké míře formují abscesy. U jelenů lesních byla zjištěna určitá souvislost věku a pohlaví na vnímavost k naze. Nejvíce náchylné byly laně starší 3 let a samci starších 2,5 roku (Macháčková a kol., 2000).

Ošetřovatelé zvířat, pracovníci živočišných provozů (zpracování těl a orgánů zvířat, nedostatečně tepelně ošetřené produkty) nebo konzumenti se mohou nakazit přímo

kapénkovou infekcí nebo pozřením infikovaných živočišných produktů. Může docházet k nákazám při ošetřování přímo klinicky nemocných zvířat a to hlavně při nedodržení hygienických zásad. Ke styku s volně žijícími infekčními zvířaty může docházet i náhodně neboť v pokročilém stádiu nemoci ztrácejí plachost a vyhledávají snadno dostupnou potravu podávanou domácím zvířatům (Pavlík a kol., 2011b).

**Obrázek 15: Možnosti přenosu infekce způsobené *Mycobacterium bovis***



Zdroj: **Biet a kol.** (2005), modifikováno

1: Infekce z kontaminovaného materiálu, 2: Přenos aerosolem, 3: Infekce ze zpracovaných produktů  
4: Vertikální přenos infekce, 5: Horizontální přenos infekce, 6: Infekce predací

### Patogeneze

Bovinní tuberkulóza se projevuje jako chronické, zánětlivé onemocnění, projevující se nekrotizujícími granulomy (**Obr. 16**), které primárně postihují plíce a lymfatické uzliny (**Brennan a Nikaido, 1995**).

Původce tuberkulózy po vniknutí do hostitele, aerogenní či alimentární cestou, proniká do tkáně a způsobuje její poškození. Poškozená tkáň reaguje exsudativním zánětem, který vyvolává zvýšené prokrvení poškozeného úseku tkáně. Tato zánětlivá změna je označována

jako **primární afekt**, což je odpověď hostitele na cizorodou látku uvolňovanou mykobakteriemi. Primární afekt většinou doprovázejí i změny v regionální mízní uzlině, do níž se mykobakterie dostávají lymfatickou cestou a v níž se tvoří tuberkulomy vzniká tzv. **úplný primární komplex** neboli **tuberkul**, který bývá označován jako primární forma nákazy. Poté dochází k definitivnímu nebo zdánlivému zastavení procesu. Primární komplex se zajišťuje nebo se původce šíří dál do organismu (**Treml a kol.**, 2014).

Pokud se původce šíří hematogenní, lymfatickou cestou nebo kanalikulárně a zachycuje se v dalších orgánech hostitele, jedná se tedy o postprimární diseminaci, čímž vzniká raná **generalizace onemocnění** (**Macháčková a kol.**, 2004).

Následně může působením různých stresových faktorů (porod, interkurentní onemocnění, hladovění, stáří) dojít k sekundárnímu rozšíření infekce za vzniku tzv. **chronické orgánové tuberkulózy**, při níž dochází často k expanzi infekce do vývodních cest a k vylučování velkého množství mykobakterií do vnějšího prostředí (**Macháčková a kol.**, 2004; **Treml a kol.**, 2014).

#### **Obrázek 16: Zvápenatělý granulom**



Zdroj: **Pavlík a kol.** (2011b)

#### **Klinické příznaky**

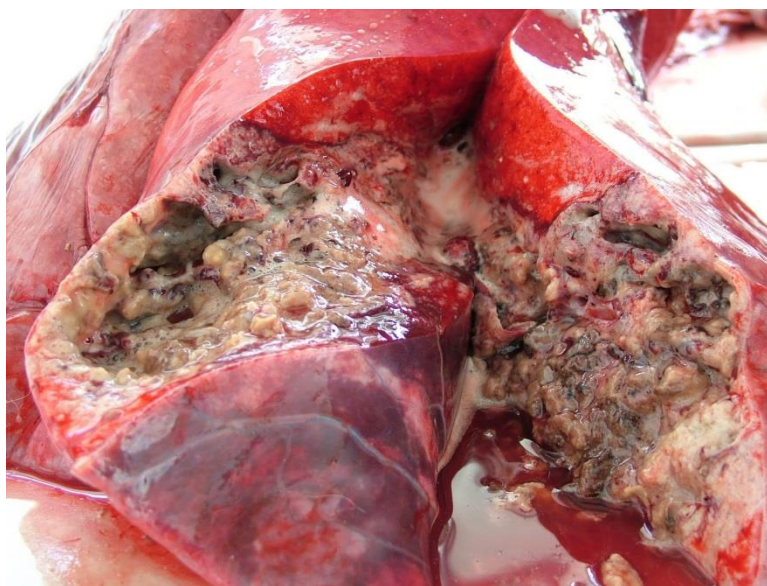
Klinické příznaky bovinní tuberkulózy jsou velmi rozmanité. Závisí na rozsahu a lokalizaci tuberkulózních změn a také na vnímavosti postižených zvířat. Bovinní tuberkulóza se řadí mezi chronicky probíhající onemocnění, a proto jedním z prvních klinických příznaků je hubnutí. Jelikož se jedná o onemocnění primárně plic je doprovázené kašlem zpočátku suchým, později vlhkým (**Cousins**, 2001; **Biet a kol.**, 2005).

Při střevní formě bovinní tuberkulózy se vyskytují trávicí poruchy zejména občasné průjmy, které mohou být s příměsí hlenu až krve (**Cousins**, 2001; **Biet a kol.**, 2005).

Tuberkulóza postihující mléčnou žlázu nemusí být dlouho patrná, později se vykytuje ve formě lobulárně infiltrativní mastitidy. Supramamární uzliny jsou silně zanícené a zvětšené. Sekret mléčné žlázy se mění také až později. Dochází ke snižování dojivosti. Sekret je vodnatý, mírně našedlý s příměsí vloček (**Morisson a kol., 2000**).

Při infekci pohlavních orgánů samců a samic dochází k narušení reprodukčních schopností. U březích zvířat může docházet ke zmetání. Při postižení ledvin bývá moč zakalená s vločkami hnisu. Při tuberkulóze centrální nervové soustavy se objevují křeče a obrny. Patologické změny (**Obr. 17**) při bovinní tuberkulóze se nejčastěji nalézají v plicích, lymfatických uzlinách, děloze, mléčné žláze a na serózách (**Treml a kol., 2014**).

### **Obrázek 17: Patologický nález na plicích lamy trpící bovinní tuberkulózou**



Zdroj: <http://bovinetb.blogspot.cz/2010/07/tuberculosis-as-it-is.html> (staženo 1. 4. 2016)

U spárkaté zvěře je průběh bovinní tuberkulózy subakutní až chronický. Akutní forma onemocnění se častěji vyskytuje u mláďat, která jsou k onemocnění vnímavější než dospělá zvěř. Klinické příznaky se liší vzhledem k různé distribuci lézí v organismu a objevují se často až těsně před úhynem. Hlavními klinickými příznaky jsou kašel, hubnutí, dyspnoe, zvětšení až abscedace povrchových mizních uzlin, což může vyvolat vznik píštělí. Dalšími klinickými příznaky může být retardovaný růst paroží nebo absence pohlavního chování u samců. K úhynu může docházet po šesti měsících až několika letech od zaznamenání klinických příznaků (**Macháčková a kol., 2000**).

### **Tuberkulinace**

Tuberkulinace je diagnostická metoda založena na aplikaci tuberkulinu intradermálním vpichem. Tuberkulín je purifikovaný proteinový derivát (PPD), získávaný

z teplem ošetřených produktů růstu a rozkladu *M. bovis* nebo *M. avium*, které jsou schopny odhalit oddálenou alergickou reakci u zvířete senzibilizovaného k mikroorganismům stejného typu (Morisson a kol., 2000).

Tuberkulin se aplikuje na hranici přední a střední třetiny krku. Kůže musí být zdravá bez chorobných změn, rovnoměrně silná s možností snadného vytvoření kožní řasy. V místě aplikace vystříhá srst. Mezi palcem a ukazováčkem se vytvoří řasa kůže a její tloušťka se po změření kutimetrem zaznamená. Dávka 0,1 ml tuberkulinu se aplikuje šikmo do nejhlubších vrstev kůže. Po intradermální aplikaci je nutno pohmatem zjistit zda došlo k vytvoření pupence v místě aplikace alergenu (Kolektiv autorů, 2002).

Reakce se posuzuje za 72 hodin po aplikaci adspekci, palpaci kůže, případně měřením zesílení kožní řasy kutimetrem (Obr. 18). V případech, že se adspekci nebo palpaci zjistí zduření kůže, stanoví se zesílení kožní řasy (reakční číslo) z rozdílu základní tloušťky kůže před aplikací a při posouzení (Tab. 17) (Kolektiv autorů, 2002).

**Obrázek 18: Měření tloušťky kožní řasy kutimetrem**



Zdroj: <https://www.fginsight.com/news/familys-bovine-tb-nightmare-highlights-horror-of-the-disease-608> (staženo 28. 3. 2016)

**Tabulka 17: Vyhodnocení jednorázové intradermatální tuberkulinace**

Reakce	Zesílení kožní řasy	Klinické příznaky
Negativní	do 2 mm	X
Dubiózní	2 – 4 mm	X
Pozitivní	nad 4 mm	difúzní/rozsáhlý otok exsudace nekróza bolestivost/zánětlivá reakce korespondujících miznic a mizních uzlin

Zdroj: Morisson a kol. (2000), Kolektiv autorů (2002)

Dle nařízení komise evropských společenství č. 1226/2002 se uznávají následující intradermální tuberkulínace:

- **jednorázová intradermální tuberkulínace** - vyšetření vyžadující jednorázovou aplikaci bovinního tuberkulinu
- **simultánní intradermální tuberkulínace** - vyšetření vyžadující jednu intradermální injekci bovinního tuberkulinu a jednu intradermální injekci aviárního tuberkulinu, podávaných současně

Zvířata, u kterých byla jednorázová intradermální tuberkulínace neprůkazná, jsou vyšetřena další intradermální tuberkulínací nejméně po 42 dnech. Pokud v tomto druhém testu negativní, jsou v tomto testu považována za pozitivní (**Kolektiv autorů**, 2002).

### ***Mycobacterium bovis* BCG**

Kmen BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) byl pojmenován podle francouzského lékaře Alberta Calmetta a veterináře Camilla Guérina, kteří od počátku 20. století pracovali na vývoji vakcíny proti tuberkulóze. Od roku 1908 začali kultivovat kmen *M. bovis*, který byl izolován z vemene krávy trpící na tuberkulózní mastitidu. Třináct let pěstovali tento kmen na bramboru se žlučí a glycerinem a provedli 231 pasáží. V roce 1921 se jim podařilo oslabit virulenci kmene natolik, že bylo možné ho použít jako očkovací látku. Dodnes je BCG vakcína jedinou dostupnou vakcínou sloužící k prevenci tuberkulózy u lidí (**Svobodová**, 2014).

Kalmetizace (očkování proti tuberkulóze) má jiný charakter než očkování proti jiným infekčním chorobám. Dítě očkované proti TBC může při opakovaném nebo trvalém kontaktu s nakažlivou osobou onemocnět. Díky očkování však dochází k urychlené aktivaci buněčné imunity, což zabrání vzniku závažných hematogenních forem, jako je miliární tuberkulóza nebo tuberkulózní meningitida. Vznikne většinou jen ohraničený nález v plicích spojený se zvětšenými lymfatickými uzlinami v plicním hilu, který je méně závažný než u neočkovaných dětí a je možné jej trvale vyléčit (**Alušíková a kol**, 2010).

### **2.2.3 Mykobakteriózy**

Netuberkulózní mykobakterie (NTM), kterých je dnes identifikováno více než 140 druhů, jsou obvykle saprofytické organismy vyskytující se v půdě, vodě, prachu či aerosolu. NTM jsou velmi přizpůsobivé a rostou v širokém rozmezí teplot, pH, salinity a tenze kyslíku. Jelikož většina z nich je podmíněně patogenní, vyvolávají onemocnění (mykobakteriózy)



typicky u zvířat či lidí s narušeným imunitním systémem. (Falkinham, 1996; Marušić a Janković, 2012).

Mykobakteriózy postihují zvířata, od ptáků přes drobné savce až po hospodářská zvířata. Jsou proto závažné nejen z ekonomického hlediska, ale zejména potencionálním přenosem na člověka konzumací masa, mléka nebo vajec (Kříž a kol., 2012). Doposud však nebyl prokázán mezilidský přenos NTM. Hlavním zdrojem nákazy je kontaminované prostředí, nejčastěji voda a půda (Griffith a kol., 2007)

U lidí lze rozdělit mykobakteriózy na základě jejich klinické manifestace do čtyř skupin infekcí.:

- Plicní infekce
- Infekce kůže a pojiva
- Lymfadenitidy periferních mízních uzlin
- Systémové infekce (Griffith a kol., 2007; Tortoli, 2009).

Tortoli (2003) ve své dřívější studii došel k závěru, že pomalu rostoucí mykobakterie jsou obvykle původci plicních a lymfatických onemocnění, zatímco rychle rostoucí druhy způsobují převážně infekce kůže a pojivových tkání.

Plicní infekce jsou nejčastějším projevem infekcí způsobených NTM. Symptomy chronických plicních onemocnění jsou variabilní a nespecifické (Tab. 11)

**Tabulka 11: Formy plicních mykobakterióz**

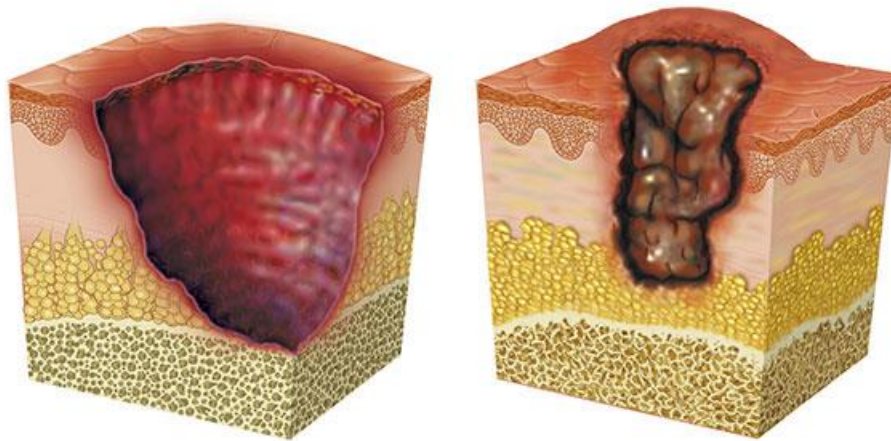
Forma	Charakteristika
Fibronodulární bronchiektázie	chronické rozšíření průdušek
Fibrokavitární forma	podobná tuberkulóze
Solitární noduly	uzlíky vznikající při interakci bakterie s hostitelovou tkání
syndrom „hot tub lung“	podobný hypersenzitivnímu plicnímu onemocnění

Zdroj: Griffith a kol. (2007)

Infekce kůže a pojivových tkání se projevují kožními lézemi, abscesy a chronickými granulomy. Tyto infekce mohou být následky infekce rány po úrazu, ale rovněž mohou být nozokomiálního původu, jako následek chirurgického zákroku. Nejvýznamnějšími původci těchto infekčních onemocnění jsou *M. marinum* a *M. ulcerans* (Griffith a kol., 2007). *M. ulcerans* způsobuje nekrotizujícího onemocnění vřed Buruli (Obr. 19), což je onemocnění vyskytující se převážně v Austrálii, Africe, Asii a Jižní Americe (Merritt a kol., 2010).

Během této infekce dochází k tvorbě velkých zjizvených vředů, lézí a chronickému stažení svalů. Nastává masivní deformace končetin, které mohou vést až k amputaci (Wang a Pancholi, 2014).

**Obrázek 19: Vřed buruli**



Zdroj: <http://www.cdc.gov/buruli-ulcer/> (staženo 28. 3. 2016)

**Lymfadenitidy** jsou záněty mízních uzlin, obvykle postihující děti do pěti let věku, neboť v tomto období dochází ke kontaktu s kontaminovanými předměty ústy. Nejčastější formou lymfadenitid je cervikální adenitida (zánět krčních uzlin). Mezi nejčastější původce patří zástupci MAC (Griffith a kol., 2007; Tortoli, 2009).

**Systémové** (diseminované) **infekce** postihují převážně imunosuprimované nebo imunodeficientní jedince, jako jsou pacienti s HIV nebo lidé po transplantacích. Cestami infekce bývá nejčastěji dýchací a trávicí trakt. Byly ovšem zaznamenány i případy nakažení přes kontaminované katetry (Otaki a kol., 2002; Tortoli, 2009).

Nejmarkantnějším problémem mykobakterióz je rezistence NTB k ATB, což vede k zdlouhavé a nákladné léčbě. V případě léčby plicní infekce způsobené MAC trvající po dobu 14 měsíců je cena zhruba 100 000 Kč (Leber a Marras, 2011).

### 3. ZÁVĚR

Mykobakterie jsou velmi odolné mikroorganismy, jež si vytvořily řadu mechanismů umožňující jim vynikající adaptabilitu k prostředí. Jedním z nich je například intracelulární parazitismus, který představuje schopnost přežít a množit se uvnitř buněk hostitele a v případě mykobakterií bývá často označován jako nejdůležitější faktor virulence. Mykobakterie jsou schopny vytvářet biofilm, což jim umožňuje mnohem vyšší odolnost vůči antimikrobiálním a dezinfekčním látkám v porovnání s jejich planktonními formami.

Původce paratuberkulózy *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* je nejpomaleji rostoucí ze všech kultivovatelných a běžná doba kultivace může v případě vzorků z malých přežvýkavců činit až šest měsíců. Původce rovněž odolává běžným teplotám pasterace, čímž hrozí šíření nákazy přes kontaminované mléko. Nejnáchylnější k infekci jsou mláďata, avšak vzhledem k velmi dlouhé inkubační době, rozvoj klinických příznaků přichází obvykle ve věku tři až pět let. Dle Evropské unie není paratuberkulóza klasifikována jako zoonóza ani jako nákaza způsobující velké ekonomické ztráty, tudíž se pro ni neschvalují ozdravovací programy. Zatímco v Evropské unii je povinnost hlásit pouze klinicky nemocná zvířata, aby se zamezilo obchodování s infikovanými zvířaty, podle legislativy České republiky je zavedena oznamovací povinnost již při podezření na výskyt paratuberkulózy. Vzhledem k tomu že paratuberkulóza je těžce diagnostikovatelné a neléčitelné onemocnění, je velice důležité zavádět kontrolní programy ve stádech, která byla vyhodnocena jako pozitivní a zabránit šíření onemocnění do negativních stád.

Tuberkulózní infekce jsou zoonotická onemocnění způsobena zástupci komplexu *Mycobacterium tuberculosis*, představující taktéž závažný problém v populacích zvířat po celém světě. Většina zástupců tohoto komplexu je schopna infikovat volně žijící druhy i zvířata chovaná v lidské péči, a to jak hospodářská, tak zoo zvířata. Patogenita tuberkulózních bacilů spočívá v jejich schopnosti přežít v hostiteli po dlouhou dobu, kde vyvolává onemocnění překonáním imunitního systému. Neméně důležitá je schopnost přežít dlouhou dobu mimo tělo hostitele, která je způsobena nepropustností mykobakteriální buněčné stěny a pomalým růstem. Po vstupu České republiky do Evropské unie byla v roce 2004 naše republika prohlášena za oficiálně prostou bovinní tuberkulózy, pokud jde o stáda skotu. Pro udržení tohoto statusu je však nutné dle platné legislativy provádět pravidelný monitoring, neboť v současné době největší riziko opětovného zavlečení bovinní tuberkulózy představuje dovoz infikovaných zvířat do zoologických zahrad a jiných

zájmových chovů. Nákaza se pak může přenést na jiná zvířata či na ošetřovatele, kteří se následně mohou stát potenciálním zdrojem infekce.

#### 4. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ADÉKAMBI, T., COLSON, P., DRANCOURT, M.: rpoB-Based Identification of Nonpigmented and Late-Pigmenting Rapidly Growing Mycobacteria, *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41, 5699–5708

ALVAREZ, J., BEZOS, J., deJUAN, L., VORDERMEIER, M., RODRIGUEZ, S., FERNANDEZ-de-MERA, I.G., MATEOS, A., DOMÍNGUEZ, L: Diagnosis of Tuberculosis in Camelids: Old Problems, Current Solutions and Future Challenges, *Transboundary and Emerging Disease*, 2012, 59, 1–10

ALUŠÍKOVÁ, M., a kol.: Očkování proti TBC u dětí, *Farmakoterapeutické informace - Měsíčník pro lékaře a farmaceuty*, 2010, 11, 1-4

APARNA, M., YADAV, S.: Biofilms: Microbes and disease, *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2008, 12, 526-530

ARSENAULT, R.J., MAATTANEN, P., DAIGLE, J., POTTER, A., GRIEBEL, P., NAPPER, S.: From mouth to macrophage: mechanisms of innate immune subversion by *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*, *Veterinary Research*, 2014, 45, 1-15

AYELE, W.Y., MACHÁČKOVÁ, M., PAVLÍK, I.: The transmission and impact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants, *Veterinární Medicína*, 2001, 7-8, 205-224

BARROW, W.W.: Treatment of mycobacterial infections, *Revue scientifique et technique office international des epizooties*, 2001, 20, 55-70

BÁRTŮ, V., MÜLLEROVÁ, M., KALINA, P., KUBÍN, M., POPĚTOVÁ, V.: Tuberkulóza vyvolaná *Mycobacterium bovis*, *Studia pneumologica et phthiseologica*, 2009, 69, 5–7

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

BAŽANT, J., ŠATRÁN, P., SEMERÁD, Z.: Paratuberkulóza skotu – koncepčnost a efektivita tlumení. In: Paratuberkulóza skotu: Sborník referátů odborného semináře, 2011, 16-18, ISBN 97880-86542-26-2.

BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ V., SCHINDLER J., SOUČEK A., VÁVRA J.: Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie, Praha, 1996, 545-558 ISBN 859-4-315-0528-0

BERAN, V., HAVELKOVÁ, M., KAUSTOVÁ, J., DVORSKÁ, L., PAVLÍK I.: Cell wall deficient forms of mycobacteria: a review, *Veterinární Medicína*, 2006, 51, 365–389

BIET, F., BOSCHIROLI, M.L., THOREL, M.F., GUILLOTEAU, L.A.: Zoonotic aspect of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC), *Veterinary research*, 2005, 36, 411–436

- BRENNAN, P.J., NIKAIDO, H.: The envelope of mycobacteria, *Annual Review of Biochemistry*, 1995, 64, 29–63
- BROSCH, R., GORDON, S.V., PYM, A., EIGLMEIER, K., GARNIER, T., COLE, S.T.: Comparative genomics of the mycobacteria, *International Journal of Medical Microbiology*, 2000, 290, 143-152
- CIRONE, K., MORSELLA, C., ROMANO, M., PAOLLICHI, F.: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in food and its relationship with Crohn's disease, *Revista Argentina de Microbiología*, 2007, 39, 57-68
- COVER, W.H., BAERWALD, R.J., LEVENS, T.: Investigation of osmotically stable spheroplasts from 2 strains of *Escherichia coli* ML-35, W7-M5, *Microbios*, 1991, 68, 23–32
- COUSINS, D.V.: *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock, *Scientific and Technical Review*, 2001, 20, 71-85
- ČERMÁK, P., AMLEROVÁ, J., SVOBODOVÁ, J., ULMANN, V., ZEMANOVÁ, I.: Základní mikrobiologická diagnostika mykobakteriálních onemocnění, Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP, 2014, 1-45
- DONLAN, R.M.: Biofilm formation: a clinically relevant microbiological proces, *Clinical infectious diseases* : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 2001, 33, 1387-1392
- 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
- FALKINHAM, J.O.: Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria, *Clinical Microbiology Revue*, 1996, 9, 177-215
- FISCHER, O., MÁTLOVÁ, L., BARTL, J., DVORSKÁ, L., MELICHÁREK, I., PAVLÍK, I.: Findings of mycobacteria in insectivores and small rodents, *Folia Microbiol*, 45, 147–152
- FLEMMING, H.C., WINGENDER, J.: The biofilm matrix, *Nature reviews Microbiology*, 2010, 8, 623-631
- FLYNN, J.L., CHAN, J.: Immunology of tuberculosis, *Annual Review of Immunology*, 2001, 19, 93– 129
- FU, Y.R., GAO, K.S., JI, R., YI, Z.J.: Differential Transcriptional Response in Macrophages Infected with Cell Wall Deficient versus normal *Mycobacterium Tuberculosis*, *International Journal of Biological Sciences*, 2015, 11, 22-30
- FUX, C.A., COSTERTON, J.W., STEWART, P.S., STOODLEY, P.: Survival strategies of infectious biofilms, *Trends in microbiology*, 2005, 13, 34-40

- GARCÍA-PÉREZ, B.E., MONDRAGÓN-FLORES, R., LUNA-HERRERA, J.: Internalization of *Mycobacterium tuberculosis* by macropinocytosis in non-phagocytic cells, *Microbial Pathogenesis*, 2003, 35, 49–55
- GILARDONI, L.R., PAOLLICHI, F.A., MUNDO, S.L.: Bovine paratuberculosis: a review of the advantages and disadvantages of different diagnostic tests, *Revue Argent Microbiology*, 2012, 44, 201-15.
- GLANEMANN, B., HOELZLE, L.E., BÖGLI-STUBER, K., JEMMI, T., WITTENBRINK, M.M.: Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Swiss dairy cattle by culture and sérology, *Schweiz Arch Für Tierheilkd*, 2004. 146, 409–415
- GRANT, I.R., KIRK, R.B., HITCHINGS, E., ROWE, M.T.: Comparative evaluation of the MGIT and BACTEC systems for the culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk, *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 95, 196-201
- GRIFFITH, D.E., AKSAMIT, T., BROWN-ELLIOT, B.A., CATANZARO, A., DALEY, C., GORDIN, F., HOLLAND, S.M., HORSBURGH, R., HUITT, G., IADEMARCO, M.F., ISEMAN, M., OLIVIER, K., RUOSS, S., VON REYN, C.F., WALLACE, R.J., WINTHROP, L.: An official ATS/IDSA statement: Diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2007, 175, 367-416
- HARRISON, J., TURNER, R., MARQUES, L., CERI, H.: Biofilms: A new understanding of these microbial communities is driving a revolution that may transform the science of microbiology, *American Scientist*, 2005, 63, 508-515
- HASOŇOVÁ, L., PAVLÍK, I., KŘÍŽ, P.: Původce paratuberkulózy – vlastnosti, jež komplikují ozdravování chovů, *Náš chov*, 2008, 7, 22-25
- HASOŇOVÁ, L., PAVLÍK, I., TRČKA, I.: Paratuberkulóza mléčného skotu, *Náš chov*, 2006, 6, 35-39
- HINES, M.E., STYER, E.L.: Preliminary characterization of chemically generated *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cell wall deficient forms (Spheroplasts), *Veterinary Microbiology*, 2003, 95, 247–258
- CHANDRASEKHAR, S.: Studies on non acid fast variants of *Mycobacterium tuberculosis*, Vallabhbai Patel Chest Institute, University of Delhi, 1992, 73, 42-44
- JOB, C.K., McCORNICK, G.T., HASTINGS, R.C.: Intracellular Parasitism of Parenchymal Cells by *Mycobacterium leprae*, *International Journal of Leprosy and Mycobacterial diseases*, 1989, 57, 659-670
- KANEENE, J.B., PFEIFFER, D.: Epidemiology of *Mycobacterium bovis*, In *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans (2nd edition), *Blackwell Publishing*, 2006, 34–48, ISBN 978-0-8138-0919-9

KAZDA, J., PAVLÍK, I., FALKINHAM, J., HRUŠKA, K.: The Ecology of Mycobacteria: Impact on Animal's and Human's Health, 2009, ISBN 978-1-4020-9413-2

KHOL, J.L., BAUMGARTNER, W.: Paratuberkulóza u přežvýkavců – epidemiologie, patogeneze, diagnostika a prevence, In: *Paratuberkulóza skotu: Sborník referátů odborného semináře*, Hradec Králové, 2011

KOČÁREK, E.: Molekulární biologie v medicíně, Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně, Brno, 2007, ss. 216, ISBN 978-80-7013-450-4

KOLEKTIV AUTORŮ: Metodický postup v prevenci šíření paratuberkulózy skotu v ČR, Zpravodaj českého svazu chovatelů masného skotu, 2008, 15, 6-7

KOLEKTIV AUTORŮ: NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 1226/2002, kterým se mění příloha B směrnice Rady 64/432/EHS, 2002, 1-10

KOLEKTIV AUTORŮ: Zpráva o činnosti v oblasti ochrany zdraví zvířat v roce 2013, Státní veterinární správa, Informační bulletin, 2014, 2, 4-87

KOLEKTIV AUTORŮ: Zpráva o činnosti v oblasti ochrany zdraví zvířat v roce 2014, Státní veterinární správa, Informační bulletin, 2015, 2, 4-97

KOPEČNÁ, M., PARMOVÁ, I., DVORSKÁ-BARTOŠOVÁ, L., MORÁVKOVÁ, M., BABÁK, V., PAVLÍK, I.: Distribution and transmission of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in farmed red deer (*Cervus elaphus*) studied by faecal culture, serology and IS900 RFLP examinations, Veterinární Medicína, 2008, 53, 510-523

KŘÍŽ, P., SLANÝ, M., SHITAYE, J., PAVLÍK, I.: Aviární mykobakterií u lidí – stále hrozící nebezpečí v České republice, *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*, 2010, 1, 10-17

LEBER, A., MARRAS, T.K.: The cost of medical management of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease in Ontario, Canada, *European Respiratory Journal*, 2011, 37, 1158-1165

LÉCU, A., BALL, R.: Mycobacterial infections in zoo animals: relevance, diagnosis and management, *International ZOO Yearbook*, 2011, 45, 183-202

LI, L., BANNANTINE, J.P., ZHANG, Q., AMONSIN, A., MAJ, 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, 12344-12349

MACENA, A., STULÍK, J., TREBICHAVSKÝ, I., KROČA, M., JANOVSKÁ, S.: Infekční choroby a intracelulární parazitismus bakterií, Praha, 2006, 156-173, ISBN 80-247-0664-4

MACHÁČKOVÁ, M., LAMKA, J., DOČEKAL, J., ŠMOLÍK, J., ZIEGROSSER, P., PAVLÍK, I.: Bovinní tuberkulóza u spárkaté zvěře, *Veterinářství*, 2000, 50, 349-355



- MACHÁČKOVÁ, M., TRČKA, I., MÁTLOVÁ, L., PAVLÍK, I.: Bovinní tuberkulóza u divokých zvířat a nebezpečí infekce člověka, *Praktický lékař*, 2004, 84, 324-327
- 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, 1-9, ISBN 978-1-84593-613-6
- MANNING, E.J.B., COLLINS, M.T.: *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis: pathogen, pathogenesis and diagnosis, *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties*, 2001, 20, 133-155
- MARKOVA, N.: Cell Wall Deficiency in Mycobacteria: Latency and Persistence, Institute of Microbiology, Bulgarian Academy of Sciences, 2012, chapter 11, 193-216, ISBN 978-953-307-946-2
- MARUŠIĆ, A., JANKOVIĆ, M.: Nontuberculous mycobacterial pulmonary disease, *Pulmonary Infection, InTech*, 2012, 55-68
- MATTMAN, L.H.: Cell Wall Deficient Forms: Stealth Pathogens (3rd ed.), *American Review of Respiratory Diseases*, 2001, 108, 381– 387, ISBN-13: 978-084-938-767-8
- MERRITT, R.W., WALKER, E.D., SMALL, P.L., WALLACE, J.R., JOHNSON, P.D., BENBOW, M.E., BOAKYE, D.A.: Ecology and Transmission of Buruli Ulcer Disease: A Systematic Review, *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2010, 4, e911
- MILLER, M.B., BASSLER, B.L.: *Quorum sensing* in bacteria, *Annual review of Microbiology*, 2001, 55, 165-199
- MORISSON, W.I., BOURNE, F.J., COX, D.R., DONNELLY, C.A., GETINBY, G., McINERNEY, J.P., WOODROFFE, R.: Pathogenesis and diagnosis of infection with *Mycobacterium bovis* in cattle, *Veterinary Record*, 2000, 146, 236-242
- NEONAKIS, I.K., GITTI, Z., KRAMBOVITIS, E., SPANDIDOS, D.A.: Molecular diagnostic tools in mycobacteriology, *Journal of Microbiological Methods*, 2008, 75, 1–11
- NGUYEN, K.T., PIASTRO, K., GRAY, T.A., DERBYSHIRE K.M.: Mycobacterial Biofilms Facilitate Horizontal DNA Transfer between Strains of *Mycobacterium smegmatis*, *Journal of bacteriology*, 2010, 192, 5134–5142
- OJHA, A., ANAND, M., BHATT, A., KREMER, L., JACOBS, W.R., HATFULL, G.F.: GroEL1: a dedicated chaperone involved in mycolic acid biosynthesis during biofilm formation in mycobacteria, *Cell*, 2005, 123, 861-873
- OTAKI, Y., NAKANISHI, T., NANAMI, M., AIZAWA, M., YANASE, K., HIRAOKA, K., IZUMI, M., INOUE, T., TAKAMITU, Y., ARAKAWA, A., ADACHI, M., MARUO, S.: A rare combination of sites of involvement by *Mycobacterium intracellulare* in a hemodialysis patient: Multifocal synovitis, spondylitis, and multiple skin lesions, *Nephron* 2002, 92, 730–734

PAVLAS, M.: Z historie tlumení bovinní tuberkulózy u skotu v Československu, Komora veterinárních lékařů české republiky, 2008, 12

PAVLÍK, I., BUREŠ, F., JANOVSKÝ, P., PEČÍNKA, P., a kol.: The last outbreak of bovine tuberculosis in cattle in the Czech Republic in 1995 was caused by *Mycobacterium bovis* subspecies *caprae*, *Veterinární Medicína*, 2002, 47, 251–263

PAVLÍK, I., HORVATHOVÁ, A., DVORSKÁ, L., BARTL, J., SVASTOVÁ, P., du MAINE, R., RYCHLÍK, I.: Standardisation of restriction fragment length polymorphism analysis for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, *Journal of Microbiology Methods*, 1999, 38, 155-167

PAVLÍK, I., PAVLAS, M., BEJČKOVÁ, L.: Výskyt, ekonomický význam a diagnostika paratuberkulózy, *Veterinární medicína*, 1994, 39

PAVLÍK, I., SLANÁ, I., KRÁLÍK, P., KRÁLOVÁ, A.: Výskyt původce paratuberkulózy v ČR a možnosti ozdravování infikovaných chovů přežvýkavců. In: Paratuberkulóza skotu: Sborník referátů odborného semináře, Hradec Králové, 2011a, 13-15, ISBN 978-80-86542-26-2

PAVLÍK, I., TRČKA, I.: Bovinní tuberkulóza u zvířat v České republice a v ostatních státech střední Evropy v letech 1990 –2004, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, *Veterinářství*, 2006, 294-298

PAVLÍK, I., ZATLOUKAL, K., FALTUS, O., BRYNDA, V., ZBOŘIL, J., LAMKA, J., ZELENKA, J., FOREJTEK, P., GIBL, J., KASINA, J., SCHOLZ, J., ŠPUNAR, J.: Mufloní zvěř 2011 – sborník přednášek, 2011b, 26-37, ISBN 978-80-254-9762-3

PHILLIPS, C.J., FOSTER, C.R., MORRIS, P.A., TEVERSON, R.: The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle, *Research in Veterinary Science*, 2003, 74, 1–15

POLLOCK, J.M., NEILL, S.D.: *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle, *The Veterinary Journal*, 2002

PTÁKOVÁ, M.: Současné laboratorní diagnostické možnosti tuberkulózy a mykobakterióz, *Medicína pro praxi*, 2011, 8, 466-468

REDDACLIFF, L.A., VADALI, A., WHITTINGTON, R.J.: The effect of decontamination protocols on the numbers of sheep strain *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from tissues and faeces, *Veterinary Microbiology*, 2003, 95, 271-282

RINGUET, H., AKOUA-KOFFI, C., HONORE, S., VARNEROT, A., VINCENT, V., BERCHE, P., GAILLARD, J.L., PIERRE-AUDIGIER C.: hsp65 Sequencing for Identification of Rapidly Growing Mycobacteria, *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37, 852–857

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

- SALGADO, M., KRUZE, J., COLLINS, M.T.: Diagnosis of paratuberculosis by fecal culture and ELISA on milk and serum samples in two types of Chilean dairy goat herds, *Journal of Veterinary Diagnosing Investing*, 2007, 19, 99-102
- SHINDLER, J.: Mikrobiální biofilm - Jak žijí bakterie v přirozeném prostředí?, *Vesmír*, 2001, 80, 203-221
- SCHOREY, J.S., SWEET, L.: The mycobacterial glycopeptidolipids: structure, function, and their role in pathogenesis, *Glycobiol*, 2008, 18, 832-841
- SLANÁ, I., DZIEDZINSKÁ, R.: Produkty zemědělských bioplynových stanic – nové, nepoznané riziko šíření původce paratuberkulózy, aviární mykobakterií a aviární tuberkulózy, *Náš chov*, 2015, 12
- SLANÁ, I., KAEVSKÁ, M., KRÁLÍK, P., HORVATHOVÁ, A., PAVLÍK, I.: Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *M. a. hominissuis* in artificially infected pigs studied by culture and IS901 and IS1245 quantitative real time PCR, *Veterinary Microbiology*, 2010, 144, 437-443
- SLANÁ, I., KOVAŘČÍK, K., BRACH, A., KLAPKA, R.: Jak na paratuberkulózu?, *Náš chov*, 2016, 1, 17-19
- SLANÁ, I., KOVAŘČÍK, K.: Postup při tlumení paratuberkulózy v chovech mléčného skotu, *Výzkumný ústav veterinárního lékařství*, Brno, 2014, 2-12, ISBN 978-80-86895-31-4
- SLAVCHEV, G., MARKOVA, N.: Genetic and morphologic variations during L-form conversion in *Mycobacterium tuberculosis*, *African Journal of Microbiology Research*, 2014, 8, 850-854
- SLAVCHEV, G., MICHAILOVA, L., MARKOVA, N.: Stress-induced L-forms of *Mycobacterium bovis*: a challenge to survivability, *New Microbiologica*, 2013, 36, 157-166
- ST-JEAN, G., JERINGAN, A.D.: Treatment of *Mycobacterium paratuberculosis* infection in ruminants, *Food Animal Practise*, 1991, 7, 793-804
- SVOBODOVÁ, J.: Vakcinační kmen *Mycobacterium bovis* BCG a očkování proti tuberkulóze, *Zprávy centra epidemiologie a mikrobiologie (SZÚ, Praha)*, 2014, 23, 182-184
- TAILLEUX, L., NEYROLLES, O., HONORÉ-BOUAKLINE, S., PERRET, E., SANCHEZ, F., ABASTADK, J.P., LAGRANDE, P.H., GLUCKMAN, J.C., ROSENZWAJG, M., HERRMANN, J.L.: Constrained Intracellular Survival of *Mycobacterium tuberculosis* in Human Dendritic Cells, *The Journal of Immunology*, 2003, 170, 1939-1948
- TAKEWAKI, S., OKUZUMI, K., MANABE, I., TANIMURA, M., MIYAMURA, K., YAZAKI, Y., OHKUBO, A., NAGAI, R.: Nucleotide Sequence Comparison of the

Mycobacterial dnaJ Gene and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for Identification of Mycobacterial Species, *Journal of Systematic Bacteriology*, 1994, 44, 159–166

TESSEMA, M.Z., KOETS, A.P., RUTTEN, V.P., GRUYS, E.: How does *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* resist intracellular degradation?, *Veterinary Quarterly*, 2001, 23, 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, 874-882

TORTOLI, E.: Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections, *Clinical Microbiology Infections*, 2009, 15, 906-910

TREML, F., LÁNY, P., POSPÍŠIL, Z., ZENDULKOVÁ, D.: Infekční choroby zvířat I - Bakteriální, mykotické a protozoární infekce, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014, 18-23, ISBN 978-80-7305-704-6

TSUKAMURA, M.: Growth physiology of mycobacteria in modified Dubos liquid medium, *Microbiol Immunology*, 1990, 34, 995–1003

VOTAVA, M., a kol.: Lékařská mikrobiologie speciální, Neptun, 2003, ss. 495, ISBN 80-902896-6-5

WANG, S.H., PANCHOLI, P.: Mycobacterial skin and soft tissue infection, *Current Infectious Disease Reports*, 2014, 16, 437-451

WHITMAN, W, a kol.: Bergeys Manual of Systematic Bacteriology, Second edition, volume five, Springer 2012, chapter Genus I. Mycobacterium, ISBN: 978-0387950433

WILTON, S., COUSINS, D.: Detection and identification of multiple mycobacterial pathogens by DNA amplification in a single tube, *Genome Research*, 1992, 1, 269–273

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

WOO, S.R., CZUPRYNSKI, CH.J.: Tactics of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* for intracellular survival in mononuclear phagocytes, *Journal of Veterinary Science*, 2008, 9, 1-8

ZAMBRANO, M.M., KOLTER, R.: Mycobacterial biofilms: a greasy way to hold it together, *Cell*, 2005, 123, 762-764

INTERNETOVÉ ZDROJE

[http://biofilmbook.hypertextbookshop.com/public\\_version/contents/appendices/appendix002/pages/page004.html](http://biofilmbook.hypertextbookshop.com/public_version/contents/appendices/appendix002/pages/page004.html)

[http://www.opbcunkov.cz/dokumenty/prednaska/Cunkov\\_PAB\\_17\\_2\\_014.pdf](http://www.opbcunkov.cz/dokumenty/prednaska/Cunkov_PAB_17_2_014.pdf)