



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Postup při tlumení paratuberkulózy v chovech mléčného skotu

Mgr. Iva Slaná, Ph.D.
MVDr. Kamil Kovařčík, Ph.D.

40
2014

UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA č. 40

Postup při tlumení paratuberkulózy v chovech mléčného skotu

Autorský kolektiv

Mgr. Iva Slaná, Ph.D., MVDr. Kamil Kovařík, Ph.D.
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno

Oponenti

MVDr. Jan Bažant
Ústřední veterinární správa SVS

MVDr. Václav Osička
Společná zdravotní komise chovatelských svazů

Metodika byla vytvořena na základě výsledků řešení projektu Ministerstva zemědělství **NAZV QI101A094** a **OP AdmireVet ED0006/01/01**

ISBN 978-80-86895-31-4

2014

I. Cíl metodiky

Paratuberkulóza, jedno z ekonomicky nákladných onemocnění domácích přežvýkavců (způsobované *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*; *MAP*) je čím dále tím více palčivým problémem chovatelů skotu. *MAP* je vylučováno především v trusu, ve spermatu a v mléce. Jedná se o chronické zánětlivé střevní onemocnění vyskytující se u domácích (skot, ovce a kozy) a divokých (jelenovití, mufloni) přežvýkavců. Charakteristickým znakem onemocnění je dlouhá inkubační doba a velká individuální variabilita v předklinické a klinické fázi rozvoje onemocnění (Ayele a kol, 2001).

Nejvíce byla patogeneze paratuberkulózy prostudována u skotu. Za vstupní bránu *MAP* do organismu je nejčastěji považován střevní trakt. Další rozvoj *MAP* ve sliznici střevní závisí na genetické odolnosti zvířat, která je založena na schopnosti makrofágů omezit nitrobuněčné množení *MAP*. Důležitá je také velikost infekční dávky, její opakování, stresy po porodu či transportu a individuální vnímavost jednotlivých plemen skotu. Některá zvířata se mohou stát přenašeči *MAP*, v tomto případě bakterie přežívají ve střevním traktu a ze sliznice střevní přecházejí fagocytované (schopné pomnožování) nahromaděnými makrofágy lymfatickou cestou do mizních uzlin a odtud do libovolného orgánu. Díky velmi komplikované stavbě buněčné stěny (vysoký obsah lipidů) je *MAP* schopno vyšší odolnosti vůči chlóru i jiným chemikáliím; je schopno přežívat v makrofázích od několika měsíců až po několik let, v říční vodě přežívá 270 dní, v trusu a černozemí 11 měsíců, v kejďe skladované ve stínu 55 týdnů a při teplotě -14°C přežívá minimálně 1 rok (Rowe a Grant 2006, Whittington a kol, 2004).



Foto: Archiv Oddělení bezpečnosti potravin a krmiv, VÚVeL



Foto: Archiv Oddělení bezpečnosti potravin a krmiv, VÚVeL

Na obou obrázcích nahoře je ilustrována typická vyhublost krav v době klinického stádia paratuberkulózy.



Foto: Archiv Oddělení bezpečnosti potravin a krmiv, VÚVeL



Foto: Archiv Oddělení bezpečnosti potravin a krmiv, VÚVeL

Na obrázku vlevo nahoře je vlevo ilustrován typický průjmovitý charakter trusu v době klinického stádia paratuberkulózy. Na pravém obrázku je detail konzistence trusu s bublinkami plynu opět charakteristické pro průběh paratuberkulózy.

Zvířata postižená paratuberkulózou není možné vyléčit, ale může být tlumena na základě kontrolního programu. Diagnostika paratuberkulózy se v dnešní době provádí řadou metod, které lze rozdělit na metody přímé (mikroskopie, kultivace a molekulárně biologické metody - PCR) a nepřímé (AGID, CFT či ELISA). Za „zlatý standard“ přímého průkazu původce paratuberkulózy je stále ještě považováno kultivační vyšetření. Nevýhodou této metody je dlouhá doba růstu *MAP* na kultivačních médiích (minimální doba je 3 měsíce). Z molekulárně biologických metod se pro přímý průkaz původce paratuberkulózy používá řada systémů založených na PCR. Nejčastěji se k detekci používají dva specifické cíle pro *MAP*. Inzerční sekvence IS900 (Green a kol, 1989) a genetický element *F57* (Poupart a kol, 1993). Při sérologickém vyšetření (ELISA) jsou detekovány protilátky, které však v raných stádiích infekce (a zejména u mladého skotu) bývají pod detekčním limitem. Jednak je jejich hladina nízká a musí se také přihlídnout k relativně pozdní protilátkové imunitní odpovědi. Udávaná citlivost ELISA metody silně závisí na použité komerční soupravě, pohybuje se v rozmezí 70 až 94 % (Nielsen a Tofr 2008).

Paratuberkulóza je celosvětovým problémem a hlášená prevalence infikovaných zvířat se značně liší. Údaje o promořenosti chovů v České republice jsou nedostupné a riziko zavlečení tohoto onemocnění do vlastního chovu je značně vysoké. V minulosti byly využity kontrolní programy založené na sérologickém vyšetření (RVK) a na kultivačních vyšetřeních zvířat starších 18 měsíců. Jednalo se o metody testování a porážení pozitivních zvířat. Součástí těchto přístupů byly i radikální restrikce na přesun zvířat a zákaz prodeje telat a býčků.

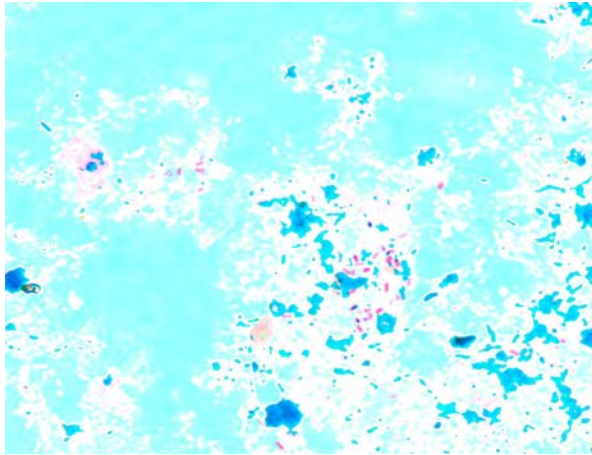


Foto: Archiv Oddělení bezpečnosti potravin a krmiv, VÚVeL

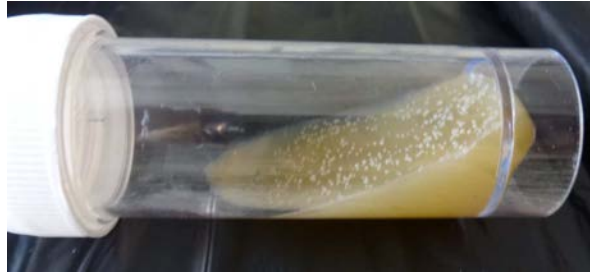


Foto: Archiv Oddělení bezpečnosti potravin a krmiv, VÚVeL

V levém rohu je zobrazen přímý nátěr trusu pro mikroskopické vyšetření (fialové tyčinky jsou původci paratuberkulózy). V pravém rohu je ukázka typického nárůstu původce paratuberkulózy na kultivačním médiu.

Nutnost vyřazení infikovaného zvířete, které vylučuje původce paratuberkulózy v trusu je jeden z klíčových okamžiků, který zůstává při tlumení paratuberkulózy stále nezměněn. Rychlá diagnostika je nutná nejenom kvůli včasnému odstranění infikovaného zvířete (ještě před vznikem a následným rozvojem klinických příznaků), ale také pro včasné zamezení šíření původce onemocnění mezi dalšími chovanými zvířaty.

II. VLASTNÍ POPIS METODIKY

0. Předmluva

Na úvod je nutno definovat **nákazový status paratuberkulózy** a přijmout vhodná opatření k tlumení této nákazy. Dle výsledků ELISA vyšetření se chovy rozdělují na:

1. chovy s vysokým promořením (více než 12 % sérologicky pozitivních zvířat)
2. chovy se středním promořením (6-12 % sérologicky pozitivních zvířat)
3. chovy s nízkým promořením (do 6 % sérologicky pozitivních zvířat)
4. chovy certifikované (chovy dlouhodobě sérologicky negativní nebo se sporadickým výskytem pozitivních zvířat)

Chovy **s vysokým promořením** je možno identifikovat jednoduchým sérologickým vyšetřením bazénového vzorku mléka. Indikací pro toto vyšetření je pravidelný výskyt klinických projevů nákazy v chovu.

Chovy **se středním promořením** je možno identifikovat vyšetřením vzorků z použitých mléčných filtrů (vzorky ze všech mléčných filtrů použitých v průběhu jednoho dojení, nebo seškrab z kovového filtru) PCR metodou – přímým průkazem patogena. Bazénové vzorky mléka jsou sérologicky negativní.

Chovy **s nízkým promořením** je nutno identifikovat screeningovým vyšetřením individuálních vzorků mléka nebo séra od reprezentativního souboru zvířat na 2. laktaci a starších. Vyšetření mléčných filtrů a bazénových vzorků mléka jsou negativní.

Obecná opatření k tlumení nákazy:

V rámci tlumení paratuberkulózy je nezbytně nutné přijmout následující zootechnická opatření týkající se zejména okolo porodního období:

- je nutné oddělit porodní boxy pro telení pozitivních a negativních krav
- telata je nutno přemístit z porodního boxu v co nejkratší době
- porodní boxy zejména pro pozitivní krávy je nutno udržovat v maximální čistotě
- telata prvotetek napájet výhradně kolostrum vlastních matek (nespoléhat ani na výsledky vyšetření!)
- kolostrum a mléko pozitivních krav podávat pouze býčkům
- jalovičkám podávat kolostrum zejména od vlastních negativních matek, pokud je matka pozitivní, je možno napojit přebytky kolostra negativních matek na 2. laktaci a starších (ne prvotetek!) příp. kolostrum negativních matek býčků, příp. náhražky kolostra
- při získávání kolostra se vyvarovat kontaminace trusem (čisté vemeno, nádoby pro napájení atd.)
- 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 neprověřených zdrojů atd.
- je vhodné vést evidenci, zda tele nepochází od pozitivní matky a původ kolostra, pokud není od vlastní matky

1. Předmět a působnost

A. Metodika tlumení paratuberkulózy v chovech s vysokým a středním promořením

Navržená metodika vychází z hypotézy, že k infekci telat dochází nejčastěji po porodu v období mléčné výživy. Hlavním zdrojem infekce je kolostrum, mléko pozitivních krav a kontaminované prostředí. Z tohoto důvodu se provádí vyšetření krav v předporodním období, abychom co nejpřesněji definovali nakažový status co nejbližší tomuto rizikovému období a následně **vyřadili kolostrum a mléko pozitivních krav z napájení jaloviček.**

Vyšetření se provádí ze vzorků krevních sér. Pro zpřesnění nálezové situace se provede vstupní vyšetření krav na 2. laktaci a starších. Provede se vyšetření skupiny krav do cca 2 měsíce březosti a krav stojících na sucho. Na základě tohoto vyšetření vyřadit dle možností chovatele pozitivní zvířata (alespoň +++) v co nejkratší době.

Vzorky krve se následně budou odebírat (asi za 2 měsíce po vstupním vyšetření) co nejdříve k termínu porodu (14 dní až maximálně 2 měsíce před termínem porodu, lépe méně). Vzorky se budou odebírat od krav před druhým porodem a starších. *Na žádanku se u prvotek uvede značka P u krav K.* Dále se doporučuje odebírat i otelené jalovice (*je třeba označit v žádance – J*) asi 2 měsíce po porodu. K telatům pozitivních jalovic se následně chovat jako k rizikovým.

Mimo tyto odběry se mohou provádět odběry krav a jalovic s podezřením na propuknutí infekce. Do žádanky se označí jako MO (mimořádný odběr a označení kategorie zvířete – J nebo P nebo K).

B. Metodika tlumení paratuberkulózy v chovech s nízkým promořením

U těchto chovů se provádí vyšetření individuálních vzorků mléka odebraných při kontrole užitkovosti metodou ELISA pro mléko od krav na 2. laktaci a starších. Pozitivní výsledky je nutno konfirmovat (potvrdit) vyšetřením z krevního séra z důvodu vyšší nespecifity vyšetřování z mléka. Vyšetření laktujících krav by mělo být provedeno 1-2x ročně.

C. Metodika tlumení paratuberkulózy v chovech s nízkým rizikem výskytu paratuberkulózy – chov pravidelně kontrolovaný

U těchto chovů se provádí vyšetření individuálních vzorků mléka odebrané při kontrole užitkovosti metodou ELISA pro mléko od krav na 2. laktaci a starších. Pozitivní výsledky jsou konfirmovány vyšetřením z krevního séra z důvodu vyšší nespecifity vyšetřování z mléka. Pozitivní zvířata v obou testech jsou dále vyšetřena z trusu metodou kultivace nebo PCR. Výsledky těchto testů pro přímý průkaz patogena musí být negativní. V případě pozitivního výsledku je zvíře ihned vyřazeno. Vyšetření laktujících krav by mělo být provedeno alespoň 1x ročně. Sérologická pozitivita u těchto chovů je do 2 % (konfirmace z krve), výsledky vyšetření přímý průkaz (kultivace, PCR) do 0,5 % všech krav.

2. Podstata zkoušky

Základním kritériem při vyšetřování stáda na původce paratuberkulózy je ELISA vyšetření krve individuálních zvířat. Na základě těchto výsledků je možné stádo zařadit do jednotlivých skupin (skupina s vysokým, středním, nízkým promořením) a postupně tlumit infekci. U sporných výsledků vyšetření u jednotlivých vzorků je možné použít i metodu kultivace či real time PCR z trusu.

Paratuberkulóza je onemocnění s velmi dlouhou inkubační dobou (2 a více let). K infekci dochází dominantně u telat po narození a v období mléčné výživy. Po odstavu telat se snižuje riziko infekce, ale zcela se nemůže vyloučit. Z toho vyplývá jedna nepřijemná věc,

a sice, že opatření, které začne chovatel provádět dle této metodiky, mohou vést ke zlepšení nálezové situace v chovu až po 2-3 letech. Do té doby se navzdory všem opatřením může situace ještě zhoršovat (tzn. zvyšovat počet pozitivních zvířat)!! Proto je třeba hlavně vytrvat a být důsledný. Čím tvrdší opatření ve smyslu vyřazování pozitivních zvířat chovatel přijme, tím strmější bude pokles pozitivních zvířat, ale až za 2-3 roky! Do té doby se bude počet krav, nutných vyřadit, zvyšovat a zpravidla bude i klesat věk pozitivních zvířat (což je velmi nepříjemné).

3. Vzorkování, manipulace se vzorkem a jeho příprava

3.1. Vzorky séra

Vzorky plné srážlivé krve je nutno nejlépe odebrat do odběrové soupravy Hemos. Vzorky je nutné po odběru nechat vysrážet při pokojové teplotě (cca 24 hod.) a transportovat do laboratoře v chlazeném stavu. Vše je nutno důkladně označit. Evidence vzorků se řídí vnitřními předpisy Centra akreditovaných laboratoří.

3.2. Vzorky mléka

3.2.1. Bazénové vzorky mléka

Vzorky mléka s minimálním objemem 100 ml je nutno odebrat do čisté (vypláchnuté) plastové láhve a po odběru transportovat do laboratoře v chlazeném stavu (4 °C). Vše je nutno důkladně označit. Evidence vzorků se řídí vnitřními předpisy Centra akreditovaných laboratoří.

3.2.2 Individuální vzorky mléka

Individuální vzorky mléka budou pro účely screeningu odebrány v rámci kontroly užitkovosti. Analýzy metodou ELISA test pro mléko provede laboratoř ČMSCH příp. zprostředkuje vyšetření PCR metodou nebo kultivací (v laboratořích mimo ČMSCH) při zachování anonymity vyšetřovaných vzorků.

3.3. Vzorky trusu

Vzorky trusu je nutno nejlépe odebrat do odběrových nádob s minimální hmotností vzorku 5 g. Vzorky je nutné po odběru transportovat do laboratoře buď v chlazeném (4 °C) či zmrazeném (-20 °C) stavu. Vše je nutno důkladně označit. Evidence vzorků se řídí vnitřními předpisy Centra akreditovaných laboratoří.

3.4. Vzorky mléčných filtrů

Vzorky mléčných filtrů (či seškrabů z kovových filtrů) se odebírají ihned po dokončení dojení (případně při jejich výměně z důvodů kapacitních). Vzorky mléčných filtrů lze

zamrazit či poslat v chlazeném stavu do laboratoře. Vše je nutno důkladně označit. Evidence vzorků se řídí vnitřními předpisy Centra akreditovaných laboratoří.

4. Výpočet a vyjádření výsledků

A. Opatření s ohledem na výsledky vyšetření krav v chovech s vysokým a středním promořením

Zvíře pozitivní na (+++)

Krávu a tele (jalovička) v co nejkratší době po porodu vyřadit z chovu. Býčka dle uvážení chovatele je možno odchovat, prodat nebo přesunout do prostorově a provozně oddělené výkrmny.

Krávy se vyřazují z toho důvodu, že po porodu v rozdojové skupině u nich velmi rychle propuká klinické onemocnění. Navíc to jsou krávy, které vylučují velké množství mykobaktérií do stájového prostředí a jsou zdrojem udržování vysokého infekčního tlaku. Telata se vyřazují z důvodu možného transplacentárního přenosu, velmi často jsou to již telata slabá s nízkou porodní hmotností. Z tohoto důvodu nemá cenu plýtvat pro tyto neperspektivní telata kolostrum negativních matek.

Zvíře pozitivní na (++)

Kráva se neinseminuje, dojí se a při prvním náznaku poklesu dojivosti příp. jiných klinických příznaků (pokles produkce, průjem) se urychleně vyřadí z chovu. Tele (jalovičku) je možno v případě standardní porodní hmotnosti odchovat, avšak musí být napojeno přebytečným kolostrum negativních krav (krav na 2. laktaci a starší!), případně náhražkou kolostra. S býčkem je možno nakládat podobně jako u krávy (+++).

Důvodem vyloučení krávy z další reprodukce je ten, že tyto krávy většinou jdou v následující laktaci do kliniky, a březost jako další zátěž tento proces urychluje. Proto tento postup umožňuje alespoň částečné ekonomické využití těchto zvířat. Telata těchto krav (které se stanou často do dalšího porodu pozitivní na +++) by byla neperspektivní a velmi riziková. Telata – jalovičky jsou sice také riziková, nicméně napojení negativním kolostrum riziko snižuje a je zde šance odchovat negativní zvíře nebo prodloužit inkubační dobu, kdy oddálíme propuknutí klinického onemocnění do vyššího věku.

Zvíře pozitivní (+) a dubiozní

Kráva se normálně inseminuje a rozhodne se na základě dalšího ELISA vyšetření před následujícím porodem. Přesto je třeba tyto krávy pravidelně sledovat a při náznaku klinických příznaků provést vyšetření (v kterékoliv fázi březosti) a při potvrzení souvislosti mezi klinickými příznaky a zvyšující se pozitivitou vyřadit z chovu.

Poznámky:

- Tato doporučení by měla platit pro chov se středním promořením (6-12 % sérologicky pozitivních zvířat za rok). Při snížení prevalence pozitivních pod 6 % za

rok by měla být opatření zpřísněná tak že ke kravám pozitivním (++) se budu chovat jako ke kravám (+++) a ke kravám (+) jako ke kravám (++).

- Pokud se bude jevit prevalence vyšší jak 12 %, naopak se kritéria změkčí a bere se do úvahy zejména celkový zdravotní stav krav.
- U stád s prevalencí vyšší než 15 % je nutno bezpodmínečně přejít na certifikované mléčné náhražky a náhražky kolostra.
- Intenzitu vyřazování pozitivních zvířat si reguluje chovatel sám, avšak pozitivní zvířata i ve vysoce promořených chovech by neměla zůstat déle než dva roky.
- Při snížení prevalence ke 2 % se začnou pozitivní zvířata konfirmovat PCR metodou z trusu.

B. Opatření s ohledem na výsledky vyšetření krav v chovech s nízkým promořením

Pozitivní zvířata by měla být vyřazena co nejdříve z chovu, nejlépe do termínu dalšího vyšetření, nejdéle však do 1 roku.

Při snížení prevalence ke 2 % se začnou pozitivní zvířata konfirmovat PCR metodou z trusu.

III. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“

Tato metodika obsahuje nové pojetí diagnostiky paratuberkulózy v chovech mléčného skotu. Novost představuje rozdělení chovů do skupin dle výsledku ELISA vyšetření a následným individuálním přístupem. Další novostí je zapojení a kombinace metod ELISA z krevních vzorků a mléka odebíraných v rámci kontroly užitkovosti, kvantitativní real time PCR či kultivace. Metodika vychází z aktuálních potřeb a požadavků chovatelů skotu.

IV. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metoda je určena pro tlumení paratuberkulózy v chovech mléčného skotu. V případě prokázání přítomnosti paratuberkulózy v chovu je možné pomocí popsané metodiky přijmout vhodná opatření zaměřená na omezení šíření patogenů na další zvířata v rámci chovu. Metodika je především určena pro chovatele skotu a pro chovatelské svazy. Uvedená metodika však může být nabídnuta i dalším laboratořím, které se podílejí na detekci veterinárních patogenů. Metodika bude uplatněna při tlumení paratuberkulózy v chovech skotu v České republice. Primárními uživateli výsledků budou konkrétní chovatelé skotu, chovatelské svazy a ČMSCH prostřednictvím laboratoří provádějící kontrolu užitkovosti.

V. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Náklady na zavedení metodiky do laboratoře

Náklady na zavedení metodiky do laboratoře je možné rozdělit do dvou kategorií. V první kategorii jsou náklady nezbytné na pořízení spotřebního materiálu, souprav na ELISA vyšetření a chemikálií na provedení kultivace a qPCR. Další náklady jsou spojené s nákupem drobného hmotného majetku, který je nutný pro provádění metody. Náklady na velké přístroje nejsou započítány, neboť jsou v současné době standardním vybavením laboratoře.

Ekonomický přínos pro chovatele

Vytvořená metodika významně napomůže při odhalování zdrojů infekce a tlumení paratuberkulózy u skotu. Předpokládáme, že monitoring chovů může významně utlumit výskyt klinických příznaků paratuberkulózy a také významně přispět k celkovému snížení prevalence paratuberkulózy v chovech skotu v České republice.

Při výskytu paratuberkulózy v chovu je pro chovatele jedním z největších problémů finanční ztráta, kterou způsobuje zejména snížení užitkovosti dojnic. Při plošném výskytu paratuberkulózy (8 % masivně vylučujících krav) ve stádu mléčného skotu čítajícím 196 kusů dojených zvířat činí přímá finanční ztráta chovatele na produkci mléka za jeden rok 598 tisíc korun. Je nutné poznamenat, že odhad finančních ztrát se týkal pouze produkce mléka a nezahrnoval další ekonomické ztráty (jako další finanční ztrátu lze uvést sníženou výkupní cenu na jatkách nebo likvidaci uhynulých zvířat).

VI. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

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

Green, E.P., Tizard, M.L., Moss, M.T., Thompson, J., Winterbourne, D.J., McFadden, J.J., Hermon-Taylor, J.: Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*, 1989, *Nucleic Acids Research*, 17: 9063-9073.

Nielsen, S.S. and N. Toft: A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe, 2008, *Preventive Veterinary Medicine*, 88: 1-14.

Poupart, P., Coene, M., Van Heuverswyn, H., Cocito, C.: Preparation of a specific RNA probe for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and diagnosis of Johne's disease, 1993, *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 1601-1605.

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

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

VII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY

METODICE

1. Slaná, I.: Paratuberkulóza. *Náš chov*, 2013, 6, 17-18.
2. Pribylova, R., Slana, I., Cech, S., Kralova, A., Pavlik, I.: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* detected in the reproductive tract of cows from an infected herd. *Reproduction in Domestic Animals*, 2013 48(5):790-4.
3. Moravkova M., Babak V., Kralova A., Pavlik I., Slana, I. Culture- and Quantitative IS900 Real-Time PCR Based Analysis of the Persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in a Controlled Dairy Cow Farm Environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78: 6608-6614.
4. Slana, I., Kralik, P., Kralova, A., Pavlik, I.: Examination of milk filters by real-time PCR as a herd-level indicator of the presence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 2012, 95: 1162-1165.
5. Pribylova, R., Slana, I., Kralik, P., Kralova, A., Babak, V., Pavlik, I.: Correlation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* counts in gastrointestinal tract, muscles of the diaphragm and the masseter of dairy cattle and potential risk for consumers. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 151: 314-318.
6. Kralik, P., Slana, I., Kralova, A., Babak, V., Whitlock, R.W., Pavlik, I.: Development of a predictive model for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in faeces by quantitative real time PCR. *Veterinary Microbiology*, 2011, 149(1-2):133-8.
7. Slana, I., Pribylova, R., Kralova, A., Pavlik, I.: Persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* at a farm-scale biogas plant supplied with manure from paratuberculosis-affected dairy cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(9), 3115-9.
8. Khol, J.L., Kralik, P., Slana, I., Beran, V., Aurich, C., Pavlik, I., Baumgartner, W.: Consecutive excretion of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in semen of a breeding bull compared to the distribution in feces, tissue and blood by IS900 and F57 quantitative real-time PCR and culture examinations. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2010, 72 (10), 1283-1288.
9. Botsaris, G., Slana, I., Liapi, M., Dodd, Ch., Economides, C., Rees, C., Pavlik, I.: Rapid detection methods for viable *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in milk and cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 141, S87–S90.
10. Slana, I., Bartos, M. Roubal, P., Pavlik, I.: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. a. avium* detected by culture, IS900 and IS901 high sensitivity PCR in bulk-tank cows' milk in the Czech Republic during the years 2002 to 2004. *Czech Journal of Food Sciences*, 2009, 27 (5), 372-378.
11. Slana, I., Liapi, M., Moravkova, M., Kralova, A., Pavlik, I.: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cow bulk tank milk in Cyprus detected by culture and quantitative IS900 and F57 real-time PCR. *Preventive Veterinary Medicine*, 2009, 89, 223-226.
12. Slana, I., Kralik, P., Kralova, A., Pavlik, I.: On-farm spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk studied by IS900 and F57 competitive real time quantitative PCR and culture examination. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 128 (2), 250-257.
13. Slana, I., Paolicchi, F., Janstova, B., Navratilova, P., Pavlik, I.: Detection methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and milk products: a review. *Veterinarni Medicina*, 2008, 53 (6), 283-306.

14. Slaná, I., Králík, P., Pavlík, I.: Detekce a kvantifikace *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* metodou real time PCR. 2009, ÚPV, Patent č. 301112 pro Českou republiku.

Dedikace:

Uvedená metodika vznikla v rámci řešení projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum „METLUM“ (QI101A094) a Operačního programu Ministerstva školství mládeže a tělovýchovy „AdmireVet“ (Centrum pro aplikovanou mikrobiologii a imunologii ve veterinární medicíně; CZ 1.05/2.1.00/01.0006, ED0006/01/01).

Oponentní posudky:

1. posudek ze státní správy: MVDr. Jan Bažant, SVS Praha
2. posudek odborníka z oboru: MVDr. Václav Osička, Společná zdravotní komise chovatelských svazů

Podíl autorů na tvorbě metodiky:

Mgr. Iva Slaná, Ph.D. (50 %), MVDr. Kamil Kovařík, Ph.D. (50 %).

Metodika vznikla ve spolupráci se Svazem chovatelů českého strakatého skotu zastoupený předsedou Doc. Dr. Ing. Josefem Kučerou.

VU^{Ve}L 

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

Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz