

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH
INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

8

39 (LXVII)
1994
0375-8427

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD
SLOVENSKÁ AKADÉMIA PÔDOHOSPODÁRSKYCH VIED

The journal publishes experimental papers and reviews from all spheres of veterinary medicine

The contents of all editions and paper summaries are covered by Current Contents - Agriculture, Biology and Environmental Sciences

Editorial Board - Redakční rada

Prof. MVDr. Jan B o u d a , DrSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

MVDr. Ivan H e r z i g , CSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Prof. MVDr. Bohumír H o f í r e k , DrSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Prof. MVDr. Karel H r u š k a , CSc. (Chairman), Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Doc. MVDr. Gabriel K o v á č , DrSc., University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

Doc. MVDr. Imrich M a r a č e k , DrSc., Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

Doc. MVDr. Ivan R o s i v a l , CSc., University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

Prof. MVDr. Bohumil Š e v č í k , DrSc., Research Institute of Feed Supplements and Veterinary Drugs, Jílové u Prahy, Czech Republic

Editor in Chief - Vedoucí redaktorka

Ing. Zdenka Radošová

THE ROLE OF THE PERIOSTEUM IN THE HEALING OF THE DOG'S MÜLLER-PLATE TREATED FEMUR FRACTURE

Z. Stojiljković, D. Capak, R. Mirčetić

Veterinary Faculty, Department of Surgery, Zagreb

There are contradictory opinions of the role of the periosteum in the conditions of stable osteosynthesis. One group of authors (Küntschner, 1970; Zucman et al., 1968) and others believe that the periosteum, especially its cambian layer, has one of the most important roles in the healing of fractures. However, other group of authors (McEwen, 1912; Antony et al., 1980) and others deny the crucial role of the periosteum in the healing of fractures. The authors of the present study performed osteosynthesis by the Müller plate in both femoral bones of 20 dogs. In the left femoral bone, the periosteum was removed 4 cm in the proximal and distal direction from the fracture site, while in the right femoral bone the periosteum remained intact. The healing of the fracture was controlled by X-ray every 15 days up to 2.5 months when the animals were subjected to euthanasia. After 2.5 months from the introduction of the fracture, the healing of the fracture line was recorded in both femoral bones. It is concluded that in the conditions of stable osteosynthesis the periosteum does not play a crucial role in the healing of bones.

bone; periosteum; fracture; osteosynthesis

The problem of bone healing has been the topic of scientific discussions since of the beginning of this era. Studies of the role of the periosteum in fracture healing date back to 1739 (Duhameil). However, the introduction of implants into treatment of fractures has raised new questions about the effect of the periosteum in the healing of fractures in the conditions of stable osteosyntheses.

Küntschner (1970), Tonna (1964), Kahnberg (1974), Zucman (1963), Coche and Neston (1974) believe that the periosteum, especially its cambian layer, plays one of the most significant roles in the healing of fractures. McEwen (1912), Anderson (1965), Braden (1976), and Antony et al. (1980), on the other hand, deny the crucial role of the periosteum in the healing of fractures.

In the literature, there is a number of data on the methods how to perform osteosynthesis and their effect on the periosteum (Anderson, 1965; Smiljanić, 1976; Watson-Jones, 1955; Antony et al., 1980; McKibbin, 1978). On the basis of the experience of the quoted authors and our own clinical observations, we were very frequently in two minds about how to treat the periosteum to perform osteosynthesis by the Müller plate.

To shed more light on the problem, in dogs we removed the periosteum in one bone and then performed, after osteosynthesis by Müller plate, artificial fracture of both femoral bones.

The periosteum is a thin connective-tissue membrane covering all bones except the patella and sesamoid bones (Nickel et al., 1968; Miller et al., 1964). The periosteum has two layers: a fibrous external layer and a deep layer rich in nerves and cells, the so-called cambian layer (Schram, 1970; Miller et al., 1964; Nickel et al., 1968). The cambian layer in itself contains several layers of large cells capable of osteogenous activity (Sarr, 1974; Nickel et al., 1968; Coche and Neston, 1974; Tonna, 1974). In some authors' view (Nickel et al., 1968; Popović et al., 1981), it is only the periosteum of younger organisms that is osteogenetically active. As the tissue ages, the cambian layer undergoes atrophy and the potential for the growth of bones is gradually diminished (Coche and Neston, 1974). Trueta (1961, 1963) and Waelchli-Suter (1980) are of the opinion that osteogenesis is closely related to the vascularization of bones. Waelchli-Suter (1980) says that the periosteum nourishes only one third of the external part of the cortex.

Kahnberg (1974) made an experiment with rats in which he screwed an opening in the tibia. In one group of rats, he covered the opening with the periosteum and in the other he removed it. He concludes that in the group with the preserved periosteum the defect healed earlier. Zucman et al. (1968) removed the periosteum from the guinea-pig tibia and made a fracture treated by the Kirschner wire. The author states that in the group with the removed periosteum no full healing of the bone occurred, whereas in the group with the preserved periosteum a solid healing was recorded. Zajić (1977) carried out osteosynthesis of the tibia by the Müller plate on the tibia of 10 dogs by previously having removed the periosteum and concludes that the healing of the bone resulted in the primary callus and that the quality of the callus was good. In the group of 10 dogs Antony et al. (1980) treated the fracture by the Müller plate, putting the plate in the subperiosteal way in one group of dogs and between the periosteum and the soft tissue in the other group of 10 dogs. The author followed up the healing histologically using tetracycline to mark the zone in which there was the growth of a new bone. In the histological preparations the author observed the tetracycline to mark the zone in which there was the growth of new bone. In the histological preparations the author observed that tetracycline was present only in the cortex and concludes that the periosteum has no role in the healing of bones. He also observed that there was no difference in healing whether the Müller plate was placed in the subperiosteal or extraperiosteal way.

MATERIAL AND METHODS

The experiment included 20 crossbred dogs, middle-sized, 15 kg body weight, aged 1 - 2 years.

The artificial fracture of both femoral bones, treated with the Müller plate, was performed in all animals. In the right femoral bone of all animals attention was paid to preserve the intact periosteum, so as not to be destroyed by the building up of the plate. In the left femoral bone of all animals the periosteum was removed 4 cm in length in the proximal and distal direction before the fixation of the plate.

Prior to surgery, all the animals were clinically examined, treated with anti-parasitocides, and their temperature, pulse, and breathing were recorded. The temperature, pulse and breathing were measured during the whole experiment which lasted 2.5 months.

The animals were X-rayed before surgery, immediately after it, 15 days later, and then after 1; 1.5; 2 and 2.5 months. After then the animals were submitted to euthanasia.

The operation was performed in narcosis using a combination of „Heptanon“ (metadon-chloride) *Pliva* at a dose of 10 mg per 10 kg body weight + „Combelen“ *Bayer* 0.3 ml per 10 kg body weight + „Atropin“ *Pliva* 1 mg per 10 kg body weight.

The operation of the left femoral bone started after a standard preparation of the operation field. A cut in the skin with scalpel began about 3 cm distally from the trochanter major and continued distally in the direction of the femoral bone 3 cm above the patella. The subcutaneous tissue was prepared by using partly blunt and partly sharp scissors. Also with scissors the incision was made of the *fascia lata* somewhat in front of the cranial border of the *m. biceps femoris*. By the operation hook the *m. biceps femoris* and the *m. vastus lateralis* of the *quadriceps* were removed aside. The *m. adductor magnus* which adjoins the caudal part of the femoral bone was cautiously separated with scissors from it 5 cm in the proximal and distal direction from where the fracture was to be performed. The *m. vastus intermedius* which adjoins the cranial side of the femoral bone was separated from the bone by cutting its fascia. The periosteum was removed 4 cm in the proximal and distal direction from where the fracture was to be performed.

The Müller plate (106 x 3.5 mm) with 6 openings for screws was modelled after the form of the femoral bone and placed on it. Then, the bone was punctured (pierced) with 3.2mm gimlet and with 4.5mm threads in the openings were made for the cortical 4.5mm screws.

The bone was cut by the Gigli saw in the middle third of the femur. During the bone cutting the fracture side was cooled with the physiological saline. The

bone cutting was done after the Müller plate was fixed to the bone, so as to obtain the identical fracture line in the left and right femoral bones.

The same operative procedure was applied to the right femoral bone of the same animal, the periosteum remaining intact. After the fracture was treated, the *fascia lata* was sutured using catgut N° 2 and the interrupted suture, while the skin was sutured with the silk interrupted suture.

After the operation the animals were given penicillin „Plivacombin“ *Pliva* at a dose of 800 000 i. u. (s/c) for six days.

The dogs were allowed to move freely in their cages after the operation.

The wounds were protected by no bandages, nor was any external immobilization used.

On the 11th day following the operation, the sutures were removed.

RESULTS

After the operation all the animals showed a slight increase of temperature (up to 39.9 °C). On the third postoperative day the temperature gradually started going down to be on the fifth day within its physiological limits. The pulse and breathing remained unchanged, i.e. within the physiological limits.

Postoperatively, all the animals showed a certain lameness, having manifested itself equally in both legs; it lasted three days and then disappeared completely.

X-RAY FINDINGS

In all the animals a filling of the fracture line in both legs was observed on the 30th day following the operation.

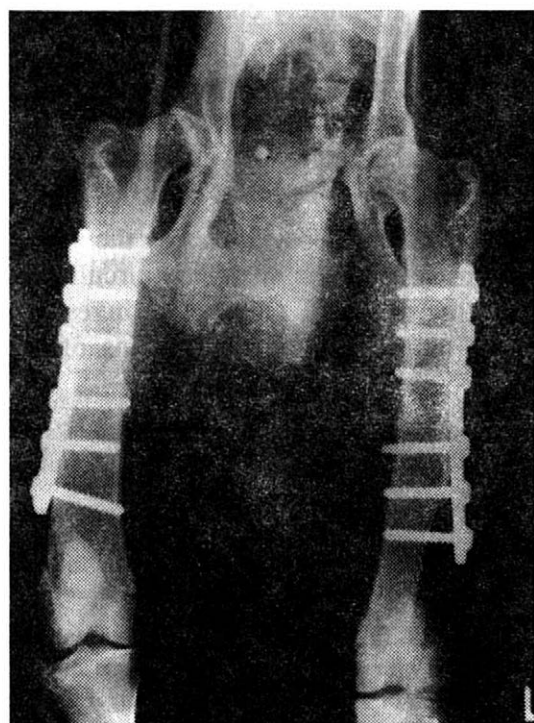
After 1.5 months following the operation, a more pronounced filling of the fracture line was recorded in 75% of dogs, while in 25% of dogs the forming of the new bones in both legs in all the dogs in the experiment.

DISCUSSION

In our experiments the dogs were 1 - 2 years old, and already grown up, their full healing took place in 2.5 months. In younger animals the time of the bone healing is considerably shorter, as confirmed by Kostić (1953), who states that the periosteum of young growing organisms is osteogenetically most potent, this being corroborated also by our clinical experience. However in 2-year old dogs no differences in healing were observed in relation to the roentgenograms of somewhat younger animals from the experiment. According to the statement that the activity of the periosteum gradually decreases with age, as reported by Coche and Neston (1974), a delay in the healing of bones should have occurred, but it should not, which we explain by a very small difference in the



1. Roetgenological presentation of both femoral bones immediately after surgery. An ideal reposition of the fragments of both femoral bones. The fracture line clearly seen



2. 2.5 months following osteosynthesis the newly formed bone entirely bridged the fracture line

age of dogs in our experiment for allowing the development of clinically (roentgenologically) visible differences in the bone healing.

After 2.5 months from the introduction of the fracture in both legs, we witnessed the healing in both the left and right legs, and what is important to point out is that there was no difference in the quality of the callus. Our results do not agree with the results of Zajić (1977), who got the healing in only 20% of cases, but the author did not mention the age of the dogs in his experiment. Zucman et al. (1963) obtained the weak callus in the animals in which the tibia had no periosteum. The reason for the incomplete callus formation in the studies of Zucman et al. (1963) appears to be the treatment of the fracture by the Kirschner wire. Under such unstable conditions the callus formation is aggravated and this might account for an incomplete healing of the periosteum-removed bone. Our results are identical with those of Smiljanić (1976), who removed the periosteum from the dog's tibia, treated the fracture by the Müller plate, and obtained the callus of equal quality in both the experimental and control groups. The same results were obtained by Antony et al. (1980). An observation of these authors is interesting: they applied tetracycline to the experimental animals as the marker for the newly formed osseous tissue. The histological analysis of the newly formed bone showed that tetracycline was present only in the cortex and not in the periosteum.

Ostogenesis and the vascularization of bones are closely connected (Truea, 1961, 1963). In the opinion of Waelchli-Suter (1980), the role of the periosteous circulation in osteogenesis is of minor importance, i.e. the periosteum nourishes only one third of the external part of the cortex, while for the cortical nourishment it is the intermedullary circulation that plays the most significant role.

Our conclusion is that in the conditions of stable osteosynthesis by the use of the Müller plate, when occurs no major devastation of the medullary circulation, the periosteum plays no crucial part in healing of bones. Our further investigations will include the histological analysis of the femoral bone callus of the animals in experiments.

Literature

- ANDERSON, L. D.: Compression plate fixation and the effect of different types of internal fixation on fracture healing. JBJS 47A, 1965: 191-208.
- ANTONY, S. B. - SEYMORE, J. C. - CARDEA, J. A.: The effect of extraperiosteal and subperiosteal exposure on the healing of fractures with compression plate fixation. In: UHTHOFF, H. K.: Current Concepts of Internal Fixation of Fractures. Berlin, Springer Verlag 1980: 287-289.

- BRADEN, T. D. - BRINKER, W. O.: Radiologic and gross anatomic evaluation of bone healing in the dog. *JAVMA*, 12, 1976: 1318-1323.
- COCHE, W. M. - NESTON, W. M.: Regeneration of tibial segment from periosteum. *Plastic-reconstructive Surgery*, 6, 1974: 675-676.
- DUHAMEL, H. L.: Sur une racine qui a la faculté de tiendre en rouge les os des animaux vivants. *Mem. Acad. Roy. Sci.*, 52, 1739.
- KAHNBERG, K. E.: Influence of periosteum on healing of tibial defects in the rat. *Odont. Revy.*, 27, 1974: 157-164.
- KOSTIĆ, A.: Osnovi normalne histologije. Beograd, Medicinska biblioteka 1953.
- KÜNTSCHER, G.: Das Kallus Problem. Stuttgart, Enke Verlag 1970.
- MCEVEN, W.: The Growth of Bone. Glasgow, James MacLehose and sons 1912: 33-38.
- McKIBBIN, B.: The Biology of fracture healing in long bones. *JBJS* 60B, 1978: 150-162.
- MILLER, M. E. - CHRISTIANSEN, H. - EVANS, E.: Anatomy of the Dog. Philadelphia, Saunders co. 1964.
- NICKEL, R. - SCHUMMER, A. - SEIFERLE, E.: Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Berlin, Parey 1968.
- POPOVIĆ, S. - PILETIĆ, O. - MRŠEVIĆ, D. - ČANKOVIĆ, J. - LACKOVIĆ, V. - BORDEVIĆ-ČAMBA, V.: Histologija. Beograd, Medicinska biblioteka 1981.
- SCHRAM, W.: Klinische und tierexperimentelle Untersuchungen über die Transplantation autoplastischer Spongiosa, Hefte zur Unfallheilkunde, Berlin, Springer Verlag 1970.
- SMILJANIĆ, B.: Važnost periosta u uvjetima stabilne osteosinteze. [Disertacija.] Zagreb 1976. - Veterinary Faculty.
- STARR, W. K.: Delayed union in fractures. London, Butterworth Medical Publ. 1974.
- TONNA, A. E.: Fracture calus formation in young and old mice observed with polarized light microscope. *Anat. Rec.*, 150, 1964: 349-361.
- TONNA, E. A.: Electron microscopy of aging skeletal cells: III The periosteum. *Lab. Invest.*, 31, 1974: 609-632.
- TRUETA, J.: The housing problem of the osteoblast. *J. Trauma*, 1, 1961: 5-12.
- TRUETA, J.: The role of the vessels in osteogenesis. *JBJS*, 45B, 1963: 402-416.
- WÄELCHLI-SUTER, C.: Vascular changes in cortical bone following intramedullary fixation. In: UHTHOFF, H. K.: Current concepts of internal fixation of fractures. Berlin, Springer Verlag 1980.
- WATSON-JONES, R.: Fractures and Joint Injuries. Edinburgh, Livingstone 1955.
- ZAJIĆ, Ž.: Fiziološka i kompresivna osteosinteza i preventivna upotreba antibiotika. [Dissertation.] Beograd 1977.
- ZUCMAN, J.: Studies on the vascular connexions between periosteum, bone and muscle. *Brit. J. Surg.*, 48, 1963: 324-328.

Arrived on 8th March 1994

STOJILJKOVIĆ, Z. - CAPAK, D. - MIRČETIĆ, R. (Fakulta veterinární medicíny, Katedra chirurgie, Záhřeb):

Úloha periosteum v procesu hojení zlomeniny stehenní kosti u psů při použití Müllerovy dlahy.

Vet. Med. - Czech, 39, 1994 (8): 435-442.

U 20 psů - kříženců jsme provedli osteosyntézu stehenní kosti pomocí Müllerovy dlahy. Na levé stehenní kosti jsme odoperovali periosteum v délce 4 cm v proximálním i distálním směru od místa zlomeniny, zatímco periosteum na pravé stehenní kosti zůstalo bez zásahu. Po 2,5 měsících po operaci rentgenová kontrola ukázala, že se zlomeniny na obou nohách zcela zahojily. Vyvozujeme z toho závěr, že periosteum nehraje žádnou významnou roli v procesu hojení zlomenin stehenní kosti při použití Müllerovy dlahy.

kost; periosteum; zlomenina; osteosyntéza

Contact Address:

Dr. Zoran Stojiljković, dipl. vet., Department of Surgery, Veterinary Faculty, University of Zagreb, Heinzelova 55, Croatia

PREVENTÍVNY ÚČINOK ZEOLITU PRI INTOXIKÁCII POTKANOV LÁTKOU VX

J. Mojžiš¹, F. Ništiar¹, G. Kováč², G. Mojžišová³

¹Lekárska fakulta Univerzity P. J. Šafárika, Košice

²Univerzita veterinárskeho lekárstva, Košice

³Huma-Lab s. r. o., Košice

V predloženej práci bol sledovaný protektívny účinok zeolitového tufu na aktivitu cholinesterázy v tkanivách a erytrocytoch u potkanov po perorálnej intoxikácii VX látkou (65,5 µg/kg). Aktivita cholinesterázy v mozgu, pečeni, slezine, stehnovej svalovine, srdci, žalúdku, duodéne, kolóne a erytrocytoch vykazovala signifikantne nižšiu aktivitu po 30-minútovej intoxikácii VX látkou v porovnaní s kontrolnou skupinou. Pri preventívnom podaní zeolitu (1,0 g/kg, 5 min pred podaním látky VX) aktivita cholinesteráz v sledovaných vzorkách bola signifikantne vyššia ako v skupine zvierat intoxikovaných VX látkou ($p < 0,001$ resp. $p < 0,01$). Výnimku tvorí duodenum, kde bola aktivita signifikantne nižšia ($p < 0,001$) a kolón, kde neboli signifikantné rozdiely medzi skupinou zvierat ktorým bol pred intoxikáciou podaný zeolit a zvieratami intoxikovanými látkou VX bez podania zeolitu.

potkany; zeolit; VX látka; tkanivová a erytrocytárna cholinesteráza

Rýchly nárast chemizácie priniesol, okrem nesporných výhod, aj určité zdravotné a hygienické problémy. V posledných desaťročiach sa v rôznych oblastiach ľudskej činnosti rozšírilo používanie organických zlúčenín fosforu (David a Richardson, 1980; Hlaváček, 1981). Súčasne s používaním týchto látok sa zvyšoval záujem o osud týchto látok v organizme (Swann a i., 1977; Švický a i., 1991; Ozmen a Akay, 1993), pretože niektoré z nich sú veľmi toxické pre človeka a zvieratá (Lennox a i., 1992).

Zníženie až zabránenie expozície je častokrát podceňované, aj keď je potrebné zdôrazniť, že z gastrointestinálneho traktu môže dôjsť k rezorbcii noxy aj po niekoľkých hodinách resp. dňoch.

Jednou z možností ako znížiť nepriaznivý účinok organofosfátov na organizmus, okrem tradičného spôsobu terapie, je použitie špecifických sorbentov so schopnosťou viazať tieto látky (Dorsch a Keller, 1972; Kováč a i., 1992). Dobré sorbčné vlastnosti má aj zeolitový tuf s vysokým obsahom klinoptilolitu, ktorý sa využíva v rôznych oblastiach poľnohospodárskej výroby (Vrzgula, 1984; Iksanov a Savinová, 1985).

V našej práci sme sa zamerali na sledovanie protektívneho účinku zeolitu (prírodného sorbentu) pri intoxikácii potkanov nervovo-paralytickou látkou.

MATERIÁL A METÓDA

Aktivita cholinesterázy (ChE) bola stanovená v mozgu, pečeni, slezine, stehnovej svalovine, srdci, žalúdku, duodéne, kolóne a erytrocytoch potkanov. Potkany, samce kmeňa Wistar (Velaz Praha) boli chované v štandardných podmienkach. Experimentálne zvieratá boli rozdelené do troch skupín: kontrolná skupina ($n = 124$), skupina intoxikovaná VX látkou ($n = 15$) a skupina, ktorá dostala zeolit pred intoxikáciou látkou VX ($n = 15$).

Látka VX (0-ethyl-S-2-diisopropylaminoethyl ester kyseliny methylthiofosforetej), technická čistota 93,5 %, bola daná perorálne v dávke 65,5 $\mu\text{g/kg}$. Tretej skupine zvierat bol 5 min pred intoxikáciou podaný zeolitový tuf (Nižný Hrabovec; SiO_2 69,22 %; MgO 0,75 %, TiO_2 0,18 %, K_2O 2,48 %; Al_2O_3 14,33 %; Na_2O 0,97 %; CaO 3,40 %; As a $\text{Pb} < 0,001$ %) v dávke 1,0 g/kg. Tuf obsahoval asi 61 % klinoptilolitu a menšie množstvo α -kristobalitu, kremeňa a vulkanického skla.

Zvieratá boli usmrtené 30 min po aplikácii látky VX. Vyšetrované orgány boli rýchlo opláchnuté a homogenizované v chladnom (4°C) 0,2 mol/l Tris-HCl pufrí o pH 7,6. Homogenát bol lyzovaný v 2% roztoku Triton X-100 (1 : 2) počas 15 minút pri teplote 4°C . Vzorky boli centrifugované pri 14 000 g (4°C , 5 min).

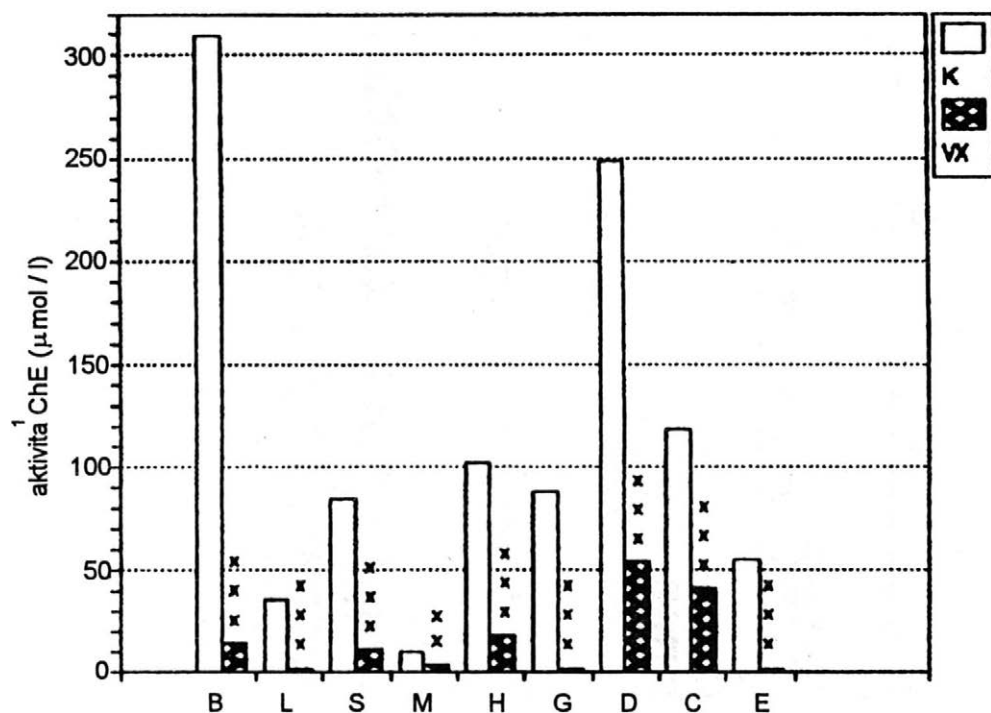
Tesne pred usmrtením bola zvieratám odobratá krv z chvostovej žily do heparinizovaných skúmaviek na stanovenie aktivity ChE v erytrocytoch.

Aktivita cholinesterázy bola stanovená v supernatante metódou podľa Tu - l a c h a (1958) v našej modifikácii (N i š t i a r a i., 1984). Enzymová aktivita je vyjadrená v μmol hydrolyzovaného substrátu na 1 g tkaniva resp. na 1 ml suspenzie erytrocytov.

Výsledky sú vyjadrené ako priemer $\pm$ S.D. Údaje boli spracované štandardnými štatistickými postupmi. Významnosť medzi aritmetickými priermi bola testovaná t -testom.

VÝSLEDKY

Na obr. 1 môžeme vidieť aktivitu ChE v tkanivách a erytrocytoch u zvierat v kontrolnej skupine a v skupine zvierat po intoxikácii látkou VX. V kontrolnej skupine bola najvyššia aktivita zistená v mozgu a v duodéne. Na druhej strane aktivita enzýmu v stehnovej svalovine vykazovala najnižšie hodnoty. V skupine zvierat intoxikovaných látkou VX vo všetkých sledovaných vzorkách došlo k signifikantnému poklesu aktivity ChE ($p < 0,001$ resp. $p < 0,01$). Najvyššia



1. Aktivita cholinesterázy (ChE) v tkanivách a erythrocytoch kontrolných potkanov (K) a u potkanov po aplikácii VX látky (VX) – Cholinesterase (ChE) activity in the tissues and erythrocytes of control sewer-rats (K) and in the sewer-rats administered VX substance (VX)

¹ activity

Vysvetlivky pre obr. 1, 2 – Explanations to Figs. 1, 2:

B = mozog – brain

G = žalúdok – stomach

L = pečeň – liver

D = duodénium – duodenum

S = slezina – spleen

C = kolón – colon

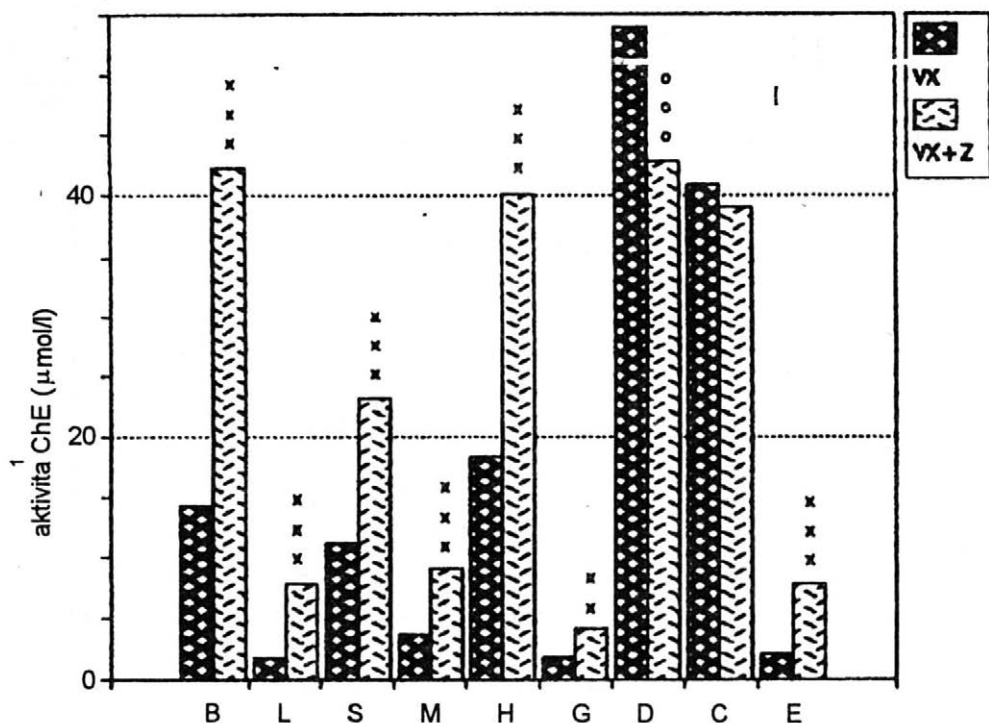
M = sval – muscle

E = erythrocyty – erythrocytes

H = srdce – heart

inhibícia enzýmu bola zistená v erythrocytoch (97,9 %) žalúdku (97,9 %), mozgu (95,4 %) a pečeni (94,7 %) pri porovnaní s kontrolnou skupinou. Relatívne najnižšia inhibícia ChE bola zistená v duodéne a kolóne.

V skupine, ktorej bol pred intoxikáciou aplikovaný zeolit, môžeme vidieť, že aktivita ChE je takmer u všetkých sledovaných vzoriek signifikantne vyššia ako v skupine bez zeolitu ($p < 0,001$ resp. $p < 0,01$; obr. 2). Výnimku tvorí duodénium, kde aktivita ChE v skupine so zeolitom bola nižšia ako v skupine bez ($p < 0,001$), a kolón, kde neboli zistené signifikantné rozdiely v aktivite medzi skupinami.



2. Aktivita cholinesterázy (ChE) v tkanivách a erythrocytoch u potkanov po aplikácii VX látky (VX) a u potkanov ktorým bol preventívne podaný zeolit (VX + Z) – Cholinesterase (ChE) activity in the tissues and erythrocytes of sewer-rats after administration of VX substance (VX) and in the rats which preventively received zeolite (VX + Z)

¹ activity

DISKUSIA

Biologický účinok organofosfátov je komplexný, ale interferuje hlavne s metabolizmom acetylcholínu a inhibícia acetylcholinesterázy prezentuje hlavný účinok organofosfátov (B a j g a r, 1985). Inhibovaný enzým nie je schopný hydrolyzovať acetylcholín a následkom jeho akumulácie dochádza k „endogénnej intoxikácii“. Z tohto dôvodu je preto zrejme, že ochrana acetylcholinesterázy bude hlavným cieľom pri terapii otráv organofosfátmi. Dnes najviac používaným spôsobom terapie otráv organofosfátmi je podávanie reaktivátorov ChE (oxími) s anticholinergne pôsobiacimi látkami (najčastejšie atropín).

Niektorí autori uvádzajú, že preventívne podaný fyzostigmín (reverzibilný inhibítor ChE) je účinný pri intoxikácii nervovoparalytickými látkami (H a r r i s a i., 1991). Taktiež intravenózne podaná cholinesteráza signifikantne znižuje intenzitu somanom vyvolanej intoxikácie (A s h a n i a i., 1991).

V predloženej práci sme sledovali účinok preventívne podaného zeolitu na aktivitu ChE po intoxikácii VX látkou. V skupine potkanov bez zeolitu bola inhibícia enzýmu rýchla a po 30-minútovej intoxikácii sa pohybovala v rozpätí 65,6 - 97,9 % v porovnaní s kontrolnou skupinou a v závislosti od druhu tkaniva. Pri použití zeolitu bola aktivita ChE signifikantne vyššia takmer vo všetkých vyšetrovaných tkanivách s výnimkou duodéna a kolónu. Tieto výsledky korešpondujú s výsledkami našich predchádzajúcich prác (Ništiar a i., 1984; Mojžiš a i., 1986), keď ako modelový organofosfát bol použitý dichlorvos. Dobrý preventívny účinok klinoptilolitu zistil aj Kováč a i. (1993) pri pokusoch na ovciach intoxikovaných VX látkou.

Na základe našich výsledkov sa môžeme domievať, že väzba látky VX na zeolit je faktorom znižujúcim jej rezorpciu z gastrointestinálneho traktu a tým znižuje jej toxicitu. Tomu by nasvedčovala aj skutočnosť, že aktivita ChE v duodéne bola signifikantne nižšia v prítomnosti zeolitu v porovnaní so skupinou zvierat, ktorým bola aplikovaná čistá VX látka bez premedikácie zeolitom. Nižšia rezorpcia z gastrointestinálneho traktu, menší podiel látky v systémovej cirkulácii, slabšie klinické prejavy intoxikácie, dlhší časový úsek pre začatie špecifickej terapie sú skutočnosťami, ktoré vytvárajú predpoklady pre zaradenie prírodného zeolitu do komplexu racionálnej prevencie a terapie otráv organofosfátmi.

Literatúra

- ASHANI, Y. - SHAPIRA, S. - LEVY, D. - WOLFE, A. D. - DOCTOR, B. P. - RAVEH, L.: Butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase prophylaxis against soman poisoning in mice. *Biochem. Pharmacol.*, 41, 1991: 37-41.
- BAJGAR, J.: Intoxikace organofosforovými inhibitory cholinesteráz: účinek, diagnóza, a terapie. *Nov. Med.*, 34, 1985: 5-40.
- DAVID, C. S. - RICHARDSON, R. J.: Organophosphorus compounds. *Exp. Clin. Neurotoxicol.*, 36, 1980: 527-554.
- DOSCH, W. - KELLER, H.: Universelle Entgiftungsmittel für chemische Kampfstoffe. *Zivilverteidigung*, 2, 1972: 68-74.
- HARRIS, L. W. - TALBOT, B. G. - LENNOX, W. J. - ANDERSON, D. R. - SOLANA, R. P.: Physostigmine (alone and together with adjunct) pretreatment against soman, sarin, tabun and VX intoxication. *Drug Chem. Toxicol.*, 14, 1991: 265-281.
- HLAVÁČEK, J.: Chemické zbraně - I. (Toxické látky). *Zprav. ÚVIS*, 1, 1981: 38-82.
- IKSANOV, R. G. - SAVVINOVÁ, M. S.: Vlivanie jakutských ceolitov na mikroklimat korovnikov i rezistentnosť životných. In: *Bulhar.-Soviet. Symp.*, 1985: 57.
- KOVÁČ, G. - BARTKO, P. - VRZGULA, L. - REICHEL, P. - NIŠTIAR, F. - MOJŽIŠ, J. - SEIDEL, H.: Preventive application of clinoptilolite during organophosphate intoxication in sheep. In: *Zeolite '93. 4th Int. Conf. on the Occurrence, Properties, and Utilization of Natural Zeolites*, Red Lion Hotel-Reverside Boise, Idaho, 1993: 138-140.

LENNOX, W. J. - HARRIS, L. W. - ANDERSON, D. R. - SOLANA, R. P. - MURROW, M. L. - WADE, J. V.: Successful pretreatment/therapy of soman, sarin, and VX intoxication. *Drug Chem. Toxicol.*, 15, 1992: 271-283.

MOJŽIŠ, J. - HRUŠOVSKÝ, J. - NIŠTIAR, F.: Využitie sorbentov prírodného pôvodu pri intoxikácii organofosfátmi. *Acta Hyg. (Praha), Epid. Mikrobiol. Přil. č. 5*, 1986: 102-104.

NIŠTIAR, F. - HRUŠOVSKÝ, J. - MOJŽIŠ, J. - MIŽIK, P.: Distribúcia dichlórvosu v organizme krýs a vplyv klinoptilolitu na intoxikáciu. *Veter. Med. (Praha)*, 29, 1984: 689-698.

OZMEN, G. - AKAY, M.T.: The effects of malathion on some hormone levels and tissues secreting these hormones in rats. *Vet. Hum. Toxicol.*, 35, 1993: 22-24.

SWANN, R. L. - SAUDERHOFF, M. W. - LASKOWSKI, D. A. - BRAUN, W. H.: The fate of phenyl N,N'-dimethylphosphorodiamidate in animals. In: IVIE, G. W. - DOROUGH, H. W. (eds): *Fate of pesticides in large animals*. New York, San Francisco, London, Academic Press Inc. 1977: 217-231.

ŠVICKÝ, E. - ŠKARDA, R. - MARCANÍK, J. - HRUŠOVSKÝ, J.: Patologicko-morfologické a histoenzymologické nálezy po intoxikácii VX látkou (organofosfát) u oviec. *Veter. Med. (Praha)*, 36, 1991: 619-623.

TULACH, J.: Kolorimetrické stanovenie cholinesterázy v ľudskej krvi. *Voj. Zdrav. Listy*, 27, 1958: 513-515.

VRZGULA, L.: Súčasný stav výskumu využitia prírodných zeolitov v živočíšnej výrobe v ČSSR. In: SLOVZEO. I. diel, Vysoké Tatry, 1984: 67.

Došlo 23. 3. 1994

MOJŽIŠ, J. - NIŠTIAR, F. - KOVÁČ, G. - MOJŽISOVÁ, G. (Faculty of Medicine of P. J. Šafárik University, Košice; University of Veterinary Medicine, Košice; Huma-Lab Ltd., Košice):

Preventive effects of zeolite in sewer-rat intoxication with VX substance.

Vet. Med. - Czech, 39, 1994 (8): 443-449.

In the present paper the effect of zeolite tuff (61% clinoptilolite) was investigated on cholinesterase activity in brain, liver, spleen, femoral muscle, heart, stomach, duodenum, colon and erythrocytes in sewer-rats after peroral intoxication with VX substance (65.5 µg/kg). Fig. 1 shows the ChE activity in the tissues and erythrocytes in the animals of control group and in the group of animals after intoxication with VX substance. The highest activity in the control group was found in brain and duodenum. The enzyme activity in the femoral muscle had the lowest values. A significant decrease in the ChE activity ($P < 0.001$ or $P < 0.01$) occurred in all the investigated samples in the group of animals intoxicated with the VX substance. The highest enzyme inhibition was observed in erythrocytes (97.9%), stomach (97.9%), brain (95.4%) and liver (94.7%) if compared with the control group. The relatively lowest inhibition was found out in duodenum and colon. In the group administered zeolite before intoxication (1.0 g/kg five minutes before intoxication) the ChE activity was significantly higher in almost all investigated samples than in the group without

zeolite ($P < 0.001$ or $P < 0.01$) - Fig. 2. The duodenum is an exception, in which the ChE activity in the zeolite group was lower than in the zeolite-free group ($P < 0.001$), as well as the colon, in which there were no significant differences in the activity between the groups. The lowest resorption rate from the gastrointestinal tract, weaker clinical signs of intoxication, longer time span for the onset of specific therapy are the facts that create conditions for inclusion of natural zeolite in the complex of rational prevention and therapy of organophosphate poisonings.

sewer-rats; zeolite; VX substance; tissue and erythrocyte cholinesterase

Contact Address:

MVDr. Ján Mojžiš, CSc., Ústav farmakológie, Lekárska fakulta Univerzity
P. J. Šafárika, Tr. SNP 1, 040 66 Košice, Slovak Republic
Tel. 095 423534, fax 095 425460

Upozorňujeme čtenáře, že v čísle 9/1994 časopisu

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

mají být uveřejněny tyto příspěvky:

V a s i l M.: Výskyt rezistencie k antibiotikám pri bakteriálnych pôvodcoch mastitíd dojníc

V a s i l M.: Terapia klinicky zjavných foriem mastitíd laktujúcich dojníc využitím intramamárneho prípravku Sulphamycin

O l e j n í k P.: Variation of somatic cell counts in colostrum and milk of first and second lactation cows during ten days after calving

L u k á š o v á J.: Mechanismus působení močoviny v mléce na kysací aktivitu mléčných kultur

Č í ž e k A., K o v a ř í k K.: Antibiotická rezistence kmenů *Salmonella typhimurium* a *S. enteritidis* izolovaných z hrabavé drůbeže v České republice v letech 1991–1992

K r a j n i č á k o v á M.: Koncentrácie sodíka, draslíka a ich vzťah k ovariálnym hormónom v čase synchronizácie ruje a gravidity bahníc

L a c i a k o v á A., L a c i a k V.: Možnosti eliminácie mikroskopických vláknitých húb dezinfekčnými prostriedkami

Z VĚDECKÉHO ŽIVOTA

H o l u b A.: Prof. MVDr. Jaroslav Lebduška, DrSc. – život a dílo

VÝSKYT, EKONOMICKÝ VÝZNAM A DIAGNOSTIKA PARATUBERKULÓZY

I. Pavlík, M. Pavlas, L. Bejčková

V období po celostátním ozdravení chovů skotu nakažených boviní tuberkulózou v Československu v roce 1968 se stále více v epizootologii mykobakteriálních infekcí uplatňují ostatní mykobakterie. U skotu je to především paratuberkulóza, která je celosvětově považována za nejrozšířenější a nejzávažnější chronické bakteriální onemocnění přežvýkavců vyvolané *Mycobacterium paratuberculosis*. V současné době se paratuberkulóza vyskytuje ve všech světadílech a způsobuje citelné ekonomické ztráty, zejména v chovech skotu, ovcí a koz, především ve státech s vyspělým zemědělstvím. V bývalém Československu v letech 1980 až 1990 byl rovněž zjištěn zvyšující se výskyt této nákazy (Pavlas aj., 1991a). Přitom rovněž nelze zcela vyloučit možnost podílu původce paratuberkulózy na onemocnění lidí (Crohnova choroba).

I když v roce 1995 uplyne 100 let od objevení původce paratuberkulózy (John a Frothingham, 1895), ještě mnoho nových poznatků v biologii tohoto onemocnění čeká na své odhalení. Vždyť v oblasti patogeneze, diagnostiky, metod tlumení, prevence (vakcinace) a dalších existují stále četné teoretické a praktické neznalosti, které ztěžují úspěšný boj s touto nákazou.

Účelem předkládaného přehledného článku je seznámit odbornou veřejnost s výskytem, ekonomickým významem a diagnostikou paratuberkulózy a doplnit tak práci autorů Štika aj. (1989).

HISTORIE OBJEVU PARATUBERKULÓZY

V evropské veterinární literatuře jsou již počátkem 19. století časté zmínky o chronickém onemocnění skotu končícím úhynem zvířete za příznaků průjmu a postupného hubnutí. Přesto ještě uběhlo jedno století, než bylo možné na základě znalostí o vztahu bakterií a onemocnění popsat původce. Profesor Heinrich Albert John z Patologického ústavu Vysoké školy veterinární v Drážďanech a jeho asistent z USA Langdon Frothingham popsali v roce 1895 u krávy onemocnění s chronickým průjmem, kdy v zesílené sliznici zjistili acidoalkoholstabilní tyčinky (AST). Toto onemocnění nazvali paratuberkulózou. Autoři zaslali materiál profesorovi Robertu Kochovi, který se domníval, že příčinou onemocnění je *M. avium*. Bang (1906) na základě biologických pokusů na telatech a dalších laboratorních zvířatech, která infikoval *per os* přímo sliznicí střevní nemocné krávy s paratuberkulózou, označil původce jako bacil pseudotuberkulózy. V tomtéž roce rektor Královské veterinární koleje v Londýně

John M'Fadyean aj. (1912) navrhli pojmenovat onemocnění po jeho objeviteli jako Johneho choroba. Poprvé se podařilo původce pomnožit v čisté kultuře ve Velké Británii v roce 1910 (Twort a Ingram, 1912). Autoři nazvali izolovaného původce *M. enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis johne*. Přestože Thorelová aj. (1990) navrhli na základě taxonomické studie používat nové rozdělení druhů *M. avium* a *M. paratuberculosis* na *M. avium* subsp. *avium* subsp. nov., *M. avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov. a *M. avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov., stále je používáno pojmenování *M. paratuberculosis*, popř. *M. johnei*.

SOUČASNÝ VÝSKYT ONEMOCNĚNÍ A EKONOMICKÉ ZTRÁTY U DOMÁCÍCH PŘEŽVÝKAVCŮ

Výskyt paratuberkulózy ve většině států Evropy a světa má stále stoupající tendenci. Nákaza byla prokázána ve všech světadílech, a to v zemích s vysokou úrovní chovu skotu, ovcí, koz, u plemen s vysokou užitkovostí a u přežvýkavců v zoologických zahradách. Nejčastěji se paratuberkulóza vyskytuje v přímořských státech západní Evropy, Spojených státech amerických, Kanadě, Austrálii a Novém Zélandu.

V Austrálii ve státě Victoria bylo infikováno v posledních pěti letech 13 % farem mléčného skotu a 0,4 % farem se skotem ve výkrmu (Stephens a Aukema, 1989). Ve státě Nový Jižní Wales byla ze 4,5 miliónu kusů skotu nákaza prokázána u 0,08 % zvířat. U ovcí byla paratuberkulóza zjištěna v 0,4 % chovů. U koz byla v tomto státě paratuberkulóza poprvé diagnostikována v roce 1977 a potvrzena ve 2,2 % stád (Everett aj., 1989).

Na Novém Zélandu (Gumbrell, 1986a, b) byly prokázány klinicky nemocné ovce paratuberkulózou v roce 1986 v 0,4 % stád Severního ostrova a v 3,7 % stád Jižního ostrova. Autor se domnívá, že skutečný výskyt paratuberkulózy může však být 2 až 3x vyšší.

V Indii byla paratuberkulóza zjištěna v celé řadě distriktů u koz, ovcí a buvolů, přičemž prevalence dosahuje v některých chovech až 30 %. Častěji jsou infekcí postižována importovaná stáda (Ghilot, 1991).

Rovněž v USA stoupá prevalence onemocnění. Častou příčinou šíření paratuberkulózy je nedodržování základních protinákazových opatření. Chiodini a VanKruiningen (1986) uvádějí např. rozprodání infikovaného stáda 95 kusů skotu ve státě Connecticut do 28 farem v osmi státech USA. McNab aj. (1991a) odhadují v letech 1986 až 1989 ve státě Ontario prevalenci nákazy na 6,1 %. Jones (1989b) předpokládá z celkového stavu 10,3 miliónů dojnic v USA infikování 3 % zvířat a ze 33 miliónů žírného skotu infekci u 1 % zvířat. Roční ztráty v USA odhaduje Merkál (1984) na 1,5 miliardy dolarů. V Mexiku dávají autoři Siegel aj. (1991) většinou výskyt paratuberkulózy skotu do souvislosti s importem zvířat z USA.

Ve Francii byla prokázána paratuberkulóza u skotu ve 38, u koz v 15 a u ovcí ve dvou z celkového počtu 89 okresů (Brugere-Picoux aj., 1988). V Portu-

galsku se vyskytlo jen několik případů paratuberkulózy ve stádech s importovanými zvířaty z Dánska a Francie (A m a d o a M a r i a n o , 1991), ve Španělsku byla paratuberkulóza prokázána vždy minimálně u jednoho stáda ovcí v distriktu (J u s t e a j . , 1991). V severní části Itálie s největší koncentrací skotu byla paratuberkulóza potvrzena v letech 1985 až 1988 v 73 chovech s výskytem klinicky nemocných zvířat (A r r i g o n i a j . , 1988).

V Maďarsku byly ekonomické ztráty zjišťovány ve stádě mléčných krav v průběhu tří let (K ö r m e n d y a j . , 1989). Produkce mléka se postupně ve sledovaném období snižovala ročně průměrně o 49, 474 a 1 030 litrů u jedné krávy. Průměrný věk zvířat se snížil ze 63,9 na 57,0 měsíců a konverze živin z krmné dávky klesla ze 60 na 39 %. V letech 1987 až 1990 byla v Řecku v oblasti Thessaloniky prokázána paratuberkulóza s klinickými příznaky ve 2,2 % stád (D i m a r e l l i a j . , 1991).

V bývalé Československé republice byla do roku 1980 paratuberkulóza diagnostikována v ojedinělých případech u domácích přežvýkavců převážně na základě klinického, patologicko-morfologického, bakterioskopického a histologického vyšetření bez kultivačního průkazu původce. Např. ve Státním veterinárním ústavu v Praze byla diagnostikována paratuberkulóza u laně bílého jelena z Žehušické obory (K r u c k ý , 1981) a ve Státním veterinárním ústavu v Plzni u jedné ovce z chovu Nečtiny v okrese Plzeň-sever, u dvou uhynulých beranů ze soukromého chovu v okrese Tachov a opakovaně u importovaných ovcí z bývalého SSSR (Č a d a , ústní sdělení). Z celkového přehledu výskytu paratuberkulózy v obou republikách v letech 1980 až 1990 (P a v l a s a j . , 1991a) vyplynulo, že největší výskyt paratuberkulózy byl v České republice zaznamenán v roce 1988, kdy z celkového počtu 70 okresů vykazovalo tuto nákazu sedm (čtyři ohniska u skotu a pět ohnisek u ovcí). Ve Slovenské republice byl největší výskyt paratuberkulózy zjištěn v roce 1989. Ze 36 okresů vykazovalo paratuberkulózu 16, přičemž výrazně převládal počet ohnisek u skotu (90), zatímco u ovcí bylo evidováno pouze 11 chovů nakažených paratuberkulózą (H a n z l í k o v á a V i l í m e k , 1989). Kromě skotu a ovcí byla paratuberkulóza zjištěna v roce 1981 u buvolce v zoologické zahradě ve Dvoře Králové, v roce 1989 v chovu daňků na okrese Hodonín (P a v l a s a j . , 1991a) a poprvé u kozy v roce 1990 (P a v l í k , 1992).

IZOLACE *M. PARATUBERCULOSIS* ZE STŘEVNÍHO TRAKTU LIDÍ

Jedním z dalších podnětů pro výzkum v oblasti paratuberkulózy je rovněž zjištění pravděpodobného podílu *M. paratuberculosis* na Crohnově chorobě (chronické onemocnění střevního traktu lidí). V USA odhaduje C h i o d i n i (1989) počet lidí postižených Crohnovou chorobou na 2,2 milionů. V Evropě činí odhad asi 2,9 mil., přičemž plných 1,4 mil. pacientů je evidováno v Německu. Asi 70 až 80 % postižených pacientů je operováno příp. i opakovaně (resekce postižené části střeva). Mortalita je nízká (průměrně 6 %), ale onemocnění je velkou fyzickou a psychickou zátěží pro nemocného. Příčiny onemocnění nejsou dosud objasněny a na etiologii onemocnění se podílí zřejmě jak infekční, tak i neinfekční faktory (rodinná predispozice,

autoimunita, výživa a další) jak uvádí Chiodini (1989). Obecně je akceptován model vzniku onemocnění, ve kterém infekční agens (např. pomalé viry, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter* sp., mykobakterie a další) způsobí senzibilizaci organismu (tzv. senzibilizační fáze). Opakovaný kontakt s nimi potom vede v tzv. indukční fázi ke klinickému onemocnění.

Při zkoumání podílu mykobakterií na Crohnově chorobě byly z resekovaného materiálu pacientů izolovány kmeny různých druhů mykobakterií: *M. kansasii* (Burnham aj., 1978), *M. fortuitum*, *M. avium*, *M. intracellulare* (Graham aj., 1987), *M. chelonae* (Gitnick aj., 1989), *M. paratuberculosis* (Chiodini aj., 1984; Thayer aj., 1984) a další. Biologické pokusy na kůzlatach prokázaly stejnou patogenitu kmene Linda izolovaného od pacientky s Crohnovou chorobou jako kmeny *M. paratuberculosis* izolované od přežvýkavců (Van Kruiningen aj., 1986). Rovněž růstové a antigenní vlastnosti byly shodné s kmeny *M. paratuberculosis* izolovanými od skotu v České a Slovenské republice (Pavlas aj., 1991b; Pavlík, 1992). Taxonomická studie Thorelové (1989) a studie genomu kmenů mykobakterií izolovaných ze sliznice stěvní pacientů nemocných Crohnovou chorobou svědčí o totožnosti s druhem *M. paratuberculosis* (Green aj., 1989; McFadden aj., 1987). První izolace kmene *M. paratuberculosis* od pacienta s Crohnovou chorobou v České republice se zdařila v roce 1993 ve Výzkumném ústavu veterinárního lékařství v Brně (Pavlík aj., 1994b).

Údaje o možném podílu *M. paratuberculosis* na Crohnově chorobě podporují i výsledky autorů Sandersona aj. (1991), kteří vysoce citlivou metodou molekulární biologie PCR (polymerase chain reaction) zjistili *M. paratuberculosis* v 65 % vzorků resekovaného ilea pacientů s Crohnovou chorobou, zatímco u kontrolních vzorků byl výskyt jen 14,8 %. Názory odborníků, kteří nesouhlasí s možností podílu *M. paratuberculosis* na Crohnově chorobě poukazují zejména na skutečnost, že ve změně sliznici resekovaného tenkého střeva není zjišťován mikroskopický či histologický nálezy mykobakterií oproti paratuberkulóze přežvýkavců (Chiodini aj., 1984; McClure aj., 1989; Chiodini, 1989). U opic (*Macaca arctoides*) byla paratuberkulóza rovněž potvrzena, přičemž klinické, patologicko-anatomické a histologické změny po spontánní infekci byly podobné onemocnění přežvýkavců (McClure aj., 1987). Při epidemiologických studiích byl větší výskyt Crohnovy choroby u lidí prokázán ve městech než na venkově. Juste aj. (1992) uvádějí, že ani u lidí pracujících se zvířaty s paratuberkulózou, jako jsou veterinární lékaři, ošetrovatelé, pracovníci na jatkách a další, nebyla zjištěna zvýšená incidence Crohnovy choroby. Rovněž je velmi obtížný průkaz protilátek v sérech pacientů (Cho aj., 1986; McFadden a Houdayer, 1988; Kobayashi aj., 1989), přestože u paratuberkulózy přežvýkavců se sérologická diagnostika běžně používá.

Z celkového přehledu vyplývá, že podíl *M. paratuberculosis* na Crohnově chorobě není spolehlivě potvrzen a zcela ojedinělý jednorázový výskyt původce paratuberkulózy nelze dosud považovat za etiologicky průkazný.

M. paratuberculosis je fakultativně anaerobní, grampozitivní, acidoalkoholstabilní (AST) tyčinka (1,5 x 0,5 µm) netvořící spory. Vyskytuje se samostatně nebo ve shlucích někdy čítajících desítky až stovky AST, které jsou spojeny mezibuněčnými filamenti (Merkal, 1973a). Původce je poměrně odolný a přežívá dlouho ve vnějším prostředí: v říční vodě 270 dní, v trusu a černozemi 11 měsíců, v močůvce při 5 °C 252 dní, v moči jen sedm dní. Při zmrazení na -14 °C přežívá minimálně jeden rok (Jorgensen, 1977; Richards, 1981; Chiodini aj., 1984).

Většinu kmenů původce paratuberkulózy je možné izolovat na půdách s růstovým stimulem, který představuje rozpustnou složku bakteriální stěny mykobakterií. Francis aj. (1953) začali používat alkoholový extrakt z *M. phlei*, který nazvali mykobaktin. Později byl extrakt pojmenován i podle původu izolace: z *M. phlei* - mykobaktin P, z *M. tuberculosis* - mykobaktin T, z *M. paratuberculosis* (*M. johnei*) - mykobaktin J (Snow, 1965; Merkaj., 1968; Merkaj. a McCullough, 1982). V současné době se nejvíce používá mykobaktin J, protože zkracuje dobu kultivace o tři týdny a zvyšuje počet kolonií o 10 až 20 % (McCullough a Merkaj., 1982). K podobným výsledkům jsme dospěli i v naší laboratoři (Pavlík, 1992; Pavlík aj., 1992).

První kmeny *M. paratuberculosis* byly izolovány v bývalém Československu na agarové půdě podle Smitha (1953) s mykobaktinem P (Pavlas aj., 1984). Na vaječném kultivačním médiu s pyruvátem sodným bez mykobaktinu se podařilo *M. paratuberculosis* izolovat v primokultivaci pouze ve zcela ojedinělých případech, a to převážně u vzorků bakterioskopicky pozitivních. Kromě výše popsaného specifického růstového stimulu mykobaktinu byla snaha najít i jiné stimulatory. Merkaj. a Curran (1974) zjistili možnost izolace kmenů *M. paratuberculosis* na půdách obohacených 1% citranem železitoamonným a pyruvátem sodným. Dobré stimulační účinky pyruvátu sodného rovněž zjistili i jiní autoři (Jorgensen, 1982; Pavlík, 1992; Kalenský, 1993).

PATOGENEZE ONEMOCNĚNÍ

Paratuberkulóza je chronické onemocnění s dlouhou inkubační dobou, která může trvat při spontánní infekci šest měsíců až 15 let (MacIndoe, 1950). Na vzniku klinické formy onemocnění se podílí mnoho dosud neobjasněných faktorů. Nejvíce vnímavá jsou mladá zvířata do věku 30 dnů (Hagan, 1938; Doyle, 1954; Rankin, 1962). Důležitá je také velikost infekční dávky a případné její opakování v průběhu života (Rankin, 1959). Dalšími predispozičními faktory jsou individuální vnímavost a plemenná příslušnost (Hole a Macclay, 1959). Onemocnění je často zjišťováno zejména u skotu plemene jersey a shorthorn (Jorgensen, 1972). Rovněž stresy, jako jsou např. špatná výživa, interkurentní onemocnění (bakteriální a parazitární), vysoká mléčná produkce, přeprava, porod a další, hrají významnou roli v patogenezi onemocnění (Hole, 1958; Chiodi-

n iaj., 1984). V našich chovech se uplatňuje u skotu rovněž špatná výživa v jarních a podzimních měsících a u ovcí v době bahnění (leden - únor) a koncem léta (P a v l í k , 1992).

S c h a a f aj. (1956) zjistili, že v infikovaných chovech nejčastěji onemocní mladé krávy ve věku 2,5 až 5 let po prvním až třetím porodu. Naproti tomu L a r s e n a M e r k a l (1968) uvádějí průměrný věk krav 6 až 9 let. V našich podmínkách jsou zaznamenány chovy s výskytem klinické paratuberkulózy jak u mladších zvířat (3 až 5 let), tak u starších (5 až 7 let). Naproti tomu u ovcí se klinická paratuberkulóza zjistila zejména u mladých zvířat ve věku dvou až tří let (P a v l í k , 1992).

Za vstupní bránu infekce se považuje nejčastěji střevní trakt. Stupeň pomnožení *M. paratuberculosis* ve sliznici střevní závisí na přirozené odolnosti zvířat, která je založena na schopnosti makrofágů omezit nitrobuněčné množení mykobakterií (B e n d i x e n , 1981). Ze sliznice střevní přecházejí mykobakterie fagocytované nahromaděnými makrofágy lymfatickou cestou do mizních uzlin a do libovolného orgánu (H o l e , 1958; G i l m o u r , 1976). Původce fagocytovaný makrofágy nemusí být degradován, ale může se v makrofázích i pomnožovat, což je spojeno s rozpadem makrofágů a rozsevem *M. paratuberculosis* krevní a lymfatickou cestou (G i l m o u r , 1985). Nahromadění makrofágů fagocytujících mykobakterie způsobuje zesílení sliznice střevní i mizních uzlin. Průjem je způsoben prostupem bílkovin a tekutiny do střevního traktu. M e r k a l aj. (1970) popisují rovněž jako příčinu průjmu hypersenzitivitu zprostředkovanou histaminem.

Po pomnožení *M. paratuberculosis* ve střevní sliznici závisí další vývoj na odolnosti zvířat. U některých jedinců může dojít ke spontánnímu uzdravení a k zániku infekce. Jiná zvířata se mohou stát nosiči původce paratuberkulózy, který přežívá ve střevním traktu a přilehlých mizních uzlinách. *M. paratuberculosis* se dostává prostřednictvím makrofágů i do dalších tkání zejména v pozdějších fázích nemoci. T a y l o r aj. (1981) izolovali původce také z mléka krav s klinickou paratuberkulózou a L a r s e n aj. (1981) izolovali původce z plic, sleziny, reprodukčních orgánů a ze semene býka využívaného pro umělou inseminaci.

DIAGNOSTIKA

Nejčastější metodou k průkazu zvířat nakažených paratuberkulózou je klinické a patologicko-morfologické vyšetření, které je v omezené míře doplněno bakteriologickým, případně histologickým vyšetřením. V některých státech se používá jako hlavní diagnostická metoda při ozdravování chovů skotu nakažených paratuberkulózou kultivační vyšetření výkalů. Uplatnění alergických a sérologických testů je ovlivněno zejména alergeny, případně antigeny používanými při těchto vyšetřeních. V chovu se nejčastěji paratuberkulóza prokáže na základě klinických příznaků u zvířat při veterinárně hygienické prohlídce na jatkách. K potvrzení nákazy je však nezbytné doplnit podezření na paratuberkulózu přímým průkazem původce laboratorním vyšetřením.

Společným syndromem pro paratuberkulózu je snižující se užitek a chronické hubnutí končící nutnou porážkou nebo úhynem zvířete (H o l e , 1958; R a n k i n , 1970; C h i o d i n i aj., 1984). U skotu se první příznaky onemocnění projevují většinou nepravidelným, různě intenzivním průjemem, který je podle většiny autorů terapeuticky neovlivnitelný. Periody zdánlivého uzdravení, kdy dochází ke zlepšení zdravotního stavu bez příznaků průjmu, mohou trvat týdny až měsíce. G i l m o u r (1976) upozornil rovněž na možný náhlý pokles doживosti, který může být prvním příznakem klinického onemocnění. Je také možné při individuálním napájení u zvířat v počátku onemocnění zjistit zvýšený příjem vody pro kompenzování ztráty tekutin (H o f f s i s , 1983). Dalšími příznaky mohou být anémie sliznic, ztráta lesku a barvy srsti zejména u plemen červeného skotu (H o l e , 1958). Výkaly jsou při dlouhotrvajícím průjmu řídké, vodnaté, často s malými bublinkami, tmavě zelené až hnědé barvy s nepříjemným zápachem (H o l e , 1958; R a n k i n , 1970). Sušina výkalů je snížena z 20 na 15 % (G i l m o u r , 1985). V důsledku ztráty vody při průjmu je kůže méně elastická a ztráta bílkovin v séru způsobuje současně výskyt otoků v mezisaničích a ve spodní části břicha (R a n k i n , 1970). Z dalších příznaků je možné u zvířat pozorovat opožděné línání srsti (S m y t h e , 1935). Klinické onemocnění může být různě dlouhé, trvající několik týdnů až měsíců (H o l e , 1958; C h i o d i n i aj., 1984). Zcela ojediněle se vyskytuje i forma onemocnění bez průjmu s celkovým hubnutím, tzv. „suchá paratuberkulóza“ (B e n e d i c t u s , 1987).

Hlavním syndromem klinické formy paratuberkulózy u ovcí a jiných domácích přežvýkavců je chronické hubnutí. U vyhublých ovcí nemocných paratuberkulózou byl zjištěn průjem pouze u 17 % zvířat (G u m b r e l l , 1986b). Rovněž jsou zjišťovány otoky mezisaničích, snížená pohyblivost a ztráta vlny (H o l e , 1958; K u m a r , 1984; G i l m o u r , 1985). U koz bývá průjem zjišťován při paratuberkulóze častěji (E a m e n s , 1989). U divokých přežvýkavců je průjem zjišťován především u jelenů (G i l m o u r , 1987). Klinická paratuberkulóza u ostatních přežvýkavců (antilopy, divoké kozy aj.) se manifestuje podobnými příznaky jako u ovcí (G r i f f i n , 1988).

Patologicko-anatomické a histologické vyšetření

Při pokročilé paratuberkulóze je u nemocného skotu nápadné především vyhubnutí a úbytek svaloviny. Při patologicko-anatomickém vyšetření často zcela chybí viscerální tuk, který je nahrazen vodnatou, gelu podobnou hmotou v okolí ledvin a srdce. Mízní uzliny střevní jsou často zvětšené, edematózní a na řezu jsou výrazně vlhké. Změny jsou lokalizovány především na střevo, kdy může být postižena buď kontinuálně velká část tenkého střeva (jejunum, ileum) nebo jen krátké úseky. Sliznice je zesílená a tvoří nevyhladitelné řasy (gyrifikace). Povrch je intaktní nebo je pokryt ulcerativními až nekrotickými změnami s petechiemi. U ovcí není zesílení sliznice střevní tak nápadné a sliznice může být někdy až citronově žlutá, příp. křehká. Oproti

skotu se mohou u ovcí a jiných přežvýkavců vyskytnout i změny nekrotického charakteru v orgánech (játra, ledviny, slezina) jak uvádí Rankin (1970). Při klinickém průběhu onemocnění byly zjištěny mikrogranulomy v pohlavním ústrojí (Larsen aj., 1981; Seitz aj., 1989), v mléčné žláze (Taylor aj., 1981) a při diseminaci v ledvinách (Hines aj., 1987). Ojedinele se vyskytují kaseózní granulomy v mizních uzlinách mezenterálních (Weidlich, 1954; Momotani a Yoshino, 1985). Kalcifikované léze se vyskytují u přežvýkavců zcela vzácně (Julian, 1975). Relativně častěji se vyskytují granulomy ve formě kaseifikovaných nebo kalcifikovaných ložisek v parenchymatózních orgánech a mizních uzlinách u malých přežvýkavců (Finn a Gunnarson, 1979).

Při histologickém vyšetření se používá přehledné barvení hematoxylin-eozínem a diferenciální barvení podle Ziehla-Neelsena (Z-N). Kritériem pro pozitivní histologickou diagnózu je přítomnost epitelioidních buněk nebo obrovských Langhansových buněk v lamina propria, příp. v submukóze sliznice střevní se současnou přítomností AST v cytoplazmě epitelioidních a obrovských buněk. Na základě samotné infiltrace lymfocyty, plazmatickými buňkami a eozinofilními granulocyty není možné stanovit diagnózu (Summers, 1981). Střevní klky jsou narušené a krátké. Žlázy krypt jsou infiltrované neutrofilními granulocyty a mukoidní substancí. Peyerovy plaky jsou obklopeny zánětlivými buňkami nebo transudátem. Granulomatózní zánět má tendenci se šířit do přilehlých mezenterálních mizních uzlin. Lymfoidní buňky v parakortikální zóně jsou většinou nahrazeny makrofágy a obrovskými buňkami. Mikroskopické změny způsobuje infiltrace syncytia epitelioidními buňkami (Gilmore, 1985). Infiltrační proces se obvykle zastavuje na ileální části ileocekální chlopně. Jestliže je postižené cecum, sliznice je jen infiltrovaná makrofágy nebo Langhansovými obrovskými buňkami, Lieberkühnovy žlázy zůstávají nepoškozené (Buergele aj., 1978).

Na počátku tohoto století Pearson (1908), M'Fadyean aj. (1912) a Harding (1957) zjistili, že masívnost bakteriologického nálezu na sliznici střevní a v příslušných mizních uzlinách nemusí být v souladu s klinickými příznaky. V našich podmínkách jsme dospěli k podobným výsledkům, protože ve skupině 33 zvířat bez klinických příznaků, která reagovala v testech intravitální diagnostiky, byla gyrifikace sliznice střevní zjištěna u 33 % zvířat (Pavlas aj., 1991b; Pavlík, 1992).

Mikroskopické vyšetření

Mikroskopické vyšetření je nejstarší poměrně jednoduchou, finančně a materiálově nenáročnou laboratorní technikou k průkazu *M. paratuberculosis* jak ve tkáních, tak ve výkalech a ostatním biologickém materiálu. Nejosvědčenejší metoda barvení podle Z-N využívá schopnosti peptidolipidů, vosků, kyselin mykolových a dalších složek bakteriální stěny přijmout karbolfuchsin a podržet si ho i při promývání odbarvovacím roztokem etanolu s kyselinou (Ris aj., 1988).

Mikroskopické vyšetření výkalů

K mikroskopickému průkazu *M. paratuberculosis* ve výkalech se prakticky výhradně používá světelné mikroskopie při zvětšení 970 až 1600x s imerzním olejem (R i s aj., 1988).

Při vyšetřování se většinou používá jedno podložní sklíčko pro jeden vzorek výkalů, případně dvě (C u n n i n g h a m a G i l m o u r, 1959) nebo až čtyři podložní sklíčka (M e r k a l aj., 1968). Rovněž v délce prohlížení, počtu zorných polí jednoho mikroskopovaného preparátu a hodnocení mikroskopického nálezu jsou v literatuře značné rozdíly (tab. I). Nález samostatných AST u zdravých zvířat z paratuberkulózního chovu nemusí souviset s paratuberkulózou (G i l m o u r, 1985). Nález AST ve shluku však u krav s klinickými příznaky paratuberkulózy z chovu s potvrzenou nákazou je považován za pozitivní (G i l m o u r, 1985). Nepravdělnost vylučování AST ve výkalech je všeobecně známá, ale autoři R i s aj. (1988) prokázali rovněž i nehomogenní výskyt ve vlastním vzorku výkalů. V naší laboratoři

I. Hodnocení mikroskopického vyšetření výkalů skotu

Autoři	Počet zorných polí	Hodnocení mikroskopického nálezu			
		+	++	+++	++++
M e r k a l aj. (1964)	200	1 S	2 - 5 S	6 - 20 S	21 a více S
R i s aj. (1988)	10	1 AST	2 - 10 AST	11 a více AST	-
S t a c h e l (1989)	200	3 - 4 S	5 - 9 S	10 - 20 S	21 a více S
H a n z l í k o v á (1988)		několik S/ZP	1 S/5 - 10 ZP	S v každém ZP	mnoho S v každém ZP

AST - acidoalkoholstabilní tyčinky

S - shluk tvořený minimálně 4 AST

ZP - zorné pole

využíváme hodnocení podle S t a c h e l s c h e i d a (1989) při prohlížení 100 zorných polí, který zjistil, že nález na + představuje asi 10^4 , ++ asi 10^5 , +++ asi 10^5 až 10^6 a ++++ asi 10^6 a více buněk *M. paratuberculosis* v 1 g výkalů.

Uváděné výsledky v tab. II dosažené mikroskopickým vyšetřením výkalů jsou značně rozdílné. Jedna skupina autorů tuto metodu zavrhuje (S c h a a f aj., 1956; J o r g e n s e n, 1983; V a l e n t e aj., 1991), druhá skupina ji považuje za vysoce spolehlivou (M e r k a l aj., 1968; S h e r m a n aj., 1984; D a v i d a B o n n i e r, 1986). V běžné diagnostické praxi má mikroskopické vyšetření

II. Mikroskopické a kultivační vyšetření výkalů skotu

Autoři	Sensitivita		Specifita		Laboratorní došetření zvířat
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
mikroskopie					
David a Bonnier (1986)	180	83,3	348	90,0	MO-, KO+ MO+, KO+ KO+kl+ KO+kl-
Jorgensen (1983)		46,0		93,8	
Pavlík (1992)	26	3,9			
	24	33,3			
Ris aj. (1988)	177	55,9	18	83,3	
Sherman aj. (1984)	26	84,6	18	94,4	
Schaaf aj. (1956)		33,3			
Stachelscheid (1989)	60,5	96,0			
Valente aj. (1991)	32	12,5			
	12	0			
kultivace					
Buergelt aj. (1977)	42	40,5			KO+
David a Bonnier (1986)	348	51,7			KO+
McDonald aj. (1989)	32	62,5			KO+
Merkal (1973b)		30,0			KO+kl+
Owen (1983)	24	62,5			KO+
Palival aj. (1985)	19	5,3			KO+kl-
	8	87,5			KO+kl+
Pavlík (1992)	26	32,0			MO-, KO+
	24	62,5			MO+, KO+
Sherman aj. (1984)	33	87,5			KO+kl+
Singh aj. (1991)	417	40,8			KO+kl+
Stachelscheid (1989)	69	55,1			KO+kl+
Valente aj. (1991)	12	16,6			KO+kl-
	32	87,5			KO+kl+
Wentink aj. (1984)		30,0			KO+kl+
Wood aj. (1988)	21	57,1			KO+
Wood aj. (1989)	15	86,7			KO+kl+

KO - kultivační průkaz původce v orgánech (střevo a příslušné mřížní uzliny)

kl - přítomnost klinických příznaků, zejména průjmu

MO - mikroskopické vyšetření (sliznice střešní)

n - počet vyšetřených zvířat

podle našich zkušeností význam zejména u zvířat s klinickými příznaky paratuberkulózy, kdy dochází k masivnímu vylučování *M. paratuberculosis* (Pavlas aj., 1991b; Pavlík, 1992).

Vzhledem k obtížnému kultivačnímu průkazu většiny kmenů od malých přežvýkaců je bakteriologické vyšetření zaměřeno především na mikroskopický průkaz původce v typických shlucích. Při hodnocení mikroskopie trusu ovcí považovali Kumar aj. (1982) za pozitivní nález jednoho shluku typických AST po prohlédnutí 200 zorných polí. Senzitivita dosahovala 70,1 % a specifita 86,0 %. Carrigan a Seaman (1990) zjistili senzitivitu pouze kolem 30 %. Gumbrell (1986a) v trusu osmi jelenů s průjmem a potvrzenou paratuberkulózou prokázal shluky typických AST u dvou zvířat a samostatné AST u dalšího zvířete.

Mikroskopické vyšetření sliznice rektu

Merkal aj. (1968) se pokusili zjistit spolehlivost vyšetření rektální sliznice skotu, kdy prokázali mikroskopicky AST jen u 20 % krav s klinickými příznaky paratuberkulózy. Z 27 pozitivně mikroskopicky vyšetřených klinicky nemocných krav byla paratuberkulóza po poražení potvrzena u 25 zvířat a z 10 dubiozních (ojetinělé AST) u šesti zvířat (Hoffsis, 1983). Selhání metody je způsobeno především lokalizací změn ve střevním traktu, kdy se změny přednostně vyskytují na sliznici ilea.

Mikroskopické vyšetření mizních uzlin mezenterálních biopsií odebraných

Malá spolehlivost metod intravitální diagnostiky zvířat v subklinickém stadiu onemocnění přivedla pracovníky v oblasti diagnostiky paratuberkulózy na myšlenku průkazu *M. paratuberculosis* v mizních uzlinách střevních po laparotomii Pemberton (1979). Histologické vyšetření preparátů odebraných při biopsii bylo však u skotu méně spolehlivé než jejich kultivace (Benedictus aj., 1983). Paliwal a Rehinder (1981) použili tuto metodu u koz.

Kultivační vyšetření a detekce růstu

Spektrum používaných půd je značně široké. V řadě laboratoří se dnes používá agarová půda s bovinním sérem (Smith, 1953). Merkaj. (1964) doporučili ke kultivaci modifikovanou půdu podle Herrolda (Herrolds-egg-yolk medium: HEYM).

Pro úspěšnou kultivaci má rozhodující význam dekontaminace inokula, protože inkubace trvá až několik měsíců. Byla vyzkoušena celá řada přípravků, z nichž se v současné době používají jen některé. Kyselina šťavelová je dnes používána v modifikaci podle Beerwertha (1967). Nejčastěji používaným přípravkem je však hexadecylpyridinium chlorid (HPC) pro jeho lepší dekontaminační účinnost a větší šetrnost vůči *M. paratuberculosis* při koncentraci 0,7 % a expozici 18 až 24 hodin (Whipple a Merkaj., 1983). Současné se zdokonalováním metod preparace

se vyvíjel i způsob ochrany půd před kontaminací přidáváním antibiotik, jako např. penicilinu v dávce 200 000 m.j./l média a chloramfenikolu v dávce 0,2 g/l l média (J o r g e n s e n , 1982). Jako fungistatika jsou používány Amphotericin B, Cycloheximid a Nystatin (M e r k a l a R i c h a r d s , 1972). V naší laboratoři (P a v l í k , 1992) máme nejlepší zkušenosti s HPC (0,75 %) a s doplněním Heroldovy půdy penicilinem (100 000 m.j./l), chloramfenikolem (50 mg/l) a Amphotericinem B (50 mg/l).

Při růstu *M. paratuberculosis* na pevných kultivačních půdách je možné makroskopicky vidět většinou malé (1 až 5 mm), tuhé, lesklé, bílé kolonie (C h i o d i n i a j . , 1984). Byla popsána i izolace pigmentovaných kmenů (žlutá až oranžová barva) od skotu a ovcí, které byly obtížně kultivovatelné (T a y l o r , 1951; S t u a r t , 1965).

C h i o d i n i (1986) zjistil, že první viditelné kolonie se začaly objevovat za 7 až 14 týdnů při 37 °C, přičemž při 30 °C byl růst výrazně méně intenzivní a při 42 °C nezaznamenal růst vůbec. U kmenů v naší laboratoři byl zaznamenán optimální růst při teplotě 37 °C, poměrně horší při teplotě 42 °C. Při teplotě 25 °C a 45 °C nebyl zjištěn žádný nárůst. V primokultivaci narostlo z 278 kmenů od skotu 99,6 % do tří měsíců (ostatní do čtyř měsíců) a ze 44 kmenů od ovcí pouze 43,2 % kmenů do tří měsíců inkubace (ostatní až do osmi měsíců). V následujících subkultivacích jen jeden kmen od skotu narostl až po pěti měsících a jeden kmen od ovcí po devíti měsících. V subkultivacích (1., 2., 3. až 5.) rostlo ze 117 kmenů od skotu 89,7; 88,6 a 88,9 % a ze 68 kmenů od ovcí 69,1; 66,7 a 66,7 % (P a v l í k , 1992).

K detekci růstu mykobakterií se využívá v některých laboratořích rovněž radio-metrická metoda, která je založena na měření množství radiokativního uhlíku (¹⁴C) v oxidu uhličitým uvolněném metabolickou aktivitou mykobakterií při růstu v médiu obsahujícím výše zmíněný radioaktivní prvek. Jako jedni z prvních využili metody při diagnostice paratuberkulózy autoři L a m b r e c h t a C o l l i n s (1985). D a m a t o a j . (1987) byli schopni v kombinaci s plynovou chromatografií zjistit růstovou závislost *M. paratuberculosis* na mykobaktinu do osmi dnů inkubace. Metoda se běžně při diagnostice paratuberkulózy nepoužívá zejména pro přístrojovou a finanční náročnost, v neposlední řadě pak pro rizikovou práci s radioizotopy.

Metodu polymerázové řetězové reakce - PCR vyzkoušeli autoři M o s s a j . (1991) při detekci růstu *M. paratuberculosis* na kultivačních médiích, kdy byli schopni detekovat již 30 buněk *M. paratuberculosis* v jednom naočkovaném médiu.

Kultivační vyšetření výkalů skotu

Kultivační vyšetření výkalů (KV) skotu je v současné době považováno za nejspolehlivější metodu při omezené citlivosti. Jednorázovým vyšetřením se zachytí asi jen 30 % vylučujících zvířat (S a n f t l e b e n , 1990). Šestinásobné opakování KV v krátkém časovém období může zvýšit záchyt až na 97 % (M c D o n a l d a j . , 1989).

Citlivost KV je odhadována asi na 100 buněk *M. paratuberculosis* v 1 g výkalů, přičemž S t a c h e l s c h e i d (1989) dosáhl citlivosti 10 CFU (colony forming

units) a R i s aj. (1988) 5 CFU. S t a c h e l s c h e i d (1989) uvádí, že v klinickém stadiu onemocnění je vylučováno u skotu až jeden milion buněk *M. paratuberculosis* v 1 g výkalů, R i c h a r d s (1990) předpokládá dokonce jednu miliardu. Přesto však není původce paratuberkulózy ve výkalech vylučován stále a současně v nich není ani rovnoměrně rozptýlen (R i s aj., 1988).

K aktivnímu vylučování dochází u přirozeně infikovaného skotu nejčastěji ve věku 2 až 2,5 roku. Z toho vyplývá ve většině protinákazových opatření prakticky neomezená pastva mladých zvířat, která však musí být oddělena od pastvy starších nakažených zvířat. KV se v praxi nepoužívá dlouho. U skotu je v některých zemích součástí postupů při ozdravování chovů od paratuberkulózy eliminační metodou (A r r i g o n i aj., 1988; C o l l i n s a M c L a u g h l i n, 1989; B e n s c h, 1993; P o h l, 1993).

Jeden z nejpropracovanějších ozdravovacích programů je od roku 1969 program pro eliminaci paratuberkulózy ve státu Wisconsin v USA (J o n e s, 1989a; C o l l i n s a M c L a u g h l i n, 1989). Současně s půlroční KV bylo přistoupeno k vakcinaci všech telat ve věku od čtyř týdnů. Z 38 000 chovů skotu byla paratuberkulóza zatím zjištěna ve 2 400 chovech. Vakcinace proti paratuberkulóze byla aplikována v 700 z nich, přičemž zcela ozdravit se podařilo do roku 1989 jen 31 chovů.

Použití KV u ostatních přežvýkavců je značně omezeno především pro obtížnou kultivovatelnost. U ovcí se kultivace z orgánů zdařila jen u 8 % zvířat z 50 s histologicky potvrzeným onemocněním (C a r r i g a n a S e a m a n, 1990). Z orgánů 54 bahní s histologicky potvrzenou paratuberkulózou se podařilo autorům J u s t e aj. (1988) izolovat *M. paratuberculosis* v 54,6 % (ileoceální mizní uzliny 36,4 %), přičemž z trusu se nepodařilo od těchto zvířat izolovat ani jeden kmen. Rovněž i u kmenů od ovcí z České republiky byla zjištěna obtížná kultivovatelnost. Z mikroskopicky pozitivního pitevního materiálu (45 vzorků) byla izolace úspěšná jen v 60 % (P a v l í k, 1992). K u m a r aj. (1982) kultivačně potvrdili paratuberkulózu u 53,3 % zvířat ze 107 histologicky pozitivních. J u s t e aj. (1991) izolovali KV *M. paratuberculosis* u 23 ovcí ze 41 s laboratorně potvrzenou paratuberkulózou po poražení. U koz se častěji izolují kmeny podobné kmenům izolovaným od skotu (B e r n a r d e l l i, 1987; L e s l i e aj., 1988; E a m e n s, 1989). U divokých přežvýkavců zcela převládají práce s velmi nízkými počty úspěšných izolací *M. paratuberculosis* (W i l l i a m s aj., 1985; G u m b r e l l, 1986a). KV je možné uplatnit za předpokladu průkazu původce do tří měsíců inkubace (kmen cirkulující v populaci pochází pravděpodobně od skotu) a zpětné identifikovatelnosti zvířat.

Úvahu autorů M i l n e r aj. (1989) o perspektivách využití KV v široké diagnostické praxi je možné v současné době zobecnit. Oproti nejpoužívanějším sérologickým metodám (IDT, CFT) má KV výhodu zejména ve specifitě (až 100 %). Nevýhodou je finanční náročnost, dlouhodobost vyšetření (několik měsíců oproti několika dnům či hodinám při sérologickém vyšetření) a relativně nízká citlivost.

Po prvním popsání této metody intravitální diagnostiky (P e m b e r t o n , 1979) ji v Holandsku úspěšně použili B e n e d i c t u s a H a a g s m a (1986) v chovu skotu s 233 zvířaty holštýnsko-fríského plemene při kombinaci metod alergického vyšetření, komplement fixačního testu (KFT) a KV. Jednorázově byla ve třech etapách vyšetřena všechna zvířata starší devíti měsíců a vyřazení všichni reagenti včetně 29 zvířat s potvrzenou paratuberkulózou v mizních uzlinách mezenterálních. V následujících dvou letech nebyl zaznamenán další výskyt klinické formy paratuberkulózy. Metoda se i přes tyto výsledky nepoužívá pro ekonomickou náročnost, chirurgický zákrok a délku kultivačního vyšetření.

Vyšetření vnějšího prostředí a dalších vzorků

Autoři R o s e n b e r g e r aj. (1991) vyšetřovali různé vzorky stájového a zevního prostředí (hlína z výběhů, seškraby ze stájí, pastva aj.). Z celkového množství 672 vzorků izolovali původce jen ve 3,0 % vzorků (izolace maximálně 15 až 20 kolonií na jedné půdce ze tří). Riziko infekce ze zevního prostředí je tedy poměrně menší než původně autoři předpokládali. Nejvíce vzorků s izolací původce pocházelo z pastvy, čímž potvrdili nutnost omezení pastvy dospělého skotu potenciálně vylučujícího původce ve výkalech.

Kultivačně bylo *M. paratuberculosis* prokázáno rovněž v děložce a jejích výplacích, v plodových obalech (R o h d e a S h u l a w , 1990), v oocytech skotu (R o h d e aj., 1990), v plodech skotu (S e i t z aj., 1989), v mléčné žláze (D o y l e , 1954), v mléce a kolostru skotu (T a y l o r aj., 1981) a v pohlavních orgánech býka (L a r s e n a K o p e c k y , 1970; L a r s e n aj., 1981).

Molekulární biologie při diagnostice paratuberkulózy

Průkaz původce ve výkalech - metoda genetické sondy

Metody molekulární biologie jsou v diagnostice perspektivní především u nemocí s obtížným průkazem a izolací původce, kterými jsou i mykobakterie.

Principem genetické sondy je vyhledávání genomu *M. paratuberculosis* ve vyšetřovaném vzorku pomocí laboratorně připraveného specifického fragmentu DNA, který je schopen detekovat 10^3 až 10^4 buněk *M. paratuberculosis* v 1 g výkalů (S a x e g a a r d a B a e s s , 1988; H u r l e y aj., 1989). Tato metoda je využívána hlavně pro druhové určení mykobakterií izolovaných *in vitro*. Přesto se však některé firmy zabývají vývojem a případně prodejem komerčních setů pro průkaz *M. paratuberculosis* ve výkalech, příp. v orgánech (S a n f t l e b e n , 1990). Na našem pracovišti byla zjištěna nízká citlivost této metody oproti kultivačnímu vyšetření, která do jisté míry omezuje její použití (K o s k o v á aj., 1991 a 1992).

Princip PCR je založen na možnosti rozdělení dvouvláknité DNA denaturací (zahřátím) a možnosti syntézy (amplifikace) nových řetězců molekul DNA *in vitro* prostřednictvím termorezistentního enzymu DNA polymerázy a specifických synteticky připravených krátkých úseků DNA (primerů). Z jedné molekuly tak vznikají dvě a při opakování cyklů denaturace DNA a syntézy nových řetězců se počet molekul zvětšuje geometrickou řadou. Teoreticky je možné namnožit specifický úsek DNA jedné molekuly, tedy jedné bakteriální buňky. Při použití primerů připravených podle specifického fragmentu IS 900 (Green aj., 1989) bylo možné detekovat *M. paratuberculosis* ve všech vzorcích výkalů, ve kterých bylo *M. paratuberculosis* kultivačně prokázáno. Přitom bylo možné zachytit i dalších 20 % u zvířat, u kterých bylo kultivační vyšetření negativní (Whipple aj., 1991). Při použití stejných primerů měli autoři Vary aj. (1990) zachytnost 100 buněk *M. paratuberculosis* v 1 ml suspenze a Challans aj. (1991) dokonce 45 buněk *M. paratuberculosis* v 1 g výkalů.

Studium vlastností kmenů *M. paratuberculosis* metodami molekulární biologie

V oblasti základního výzkumu mykobakterií jsou využívány především metody štěpení DNA restrikčními endonukleázami na fragmenty (DNA fingerprinting), které jsou pak následně rozděleny elektroforeticky podle své molekulové hmotnosti (Collins a DeLisle, 1986; Whipple aj., 1987; Hurley aj., 1988; Saxegaard a Baess, 1988; Whipple, 1989, 1990). Takto rozdělené fragmenty DNA slouží k vzájemnému srovnávání jednotlivých druhů mykobakterií i k porovnávání kmenů uvnitř jednoho druhu.

Autoři Collins aj. (1990) při vyšetření 26 kmenů *M. paratuberculosis* třemi restrikčními endonukleázami zjistili velkou genetickou homogenitu kmenů od skotu oproti kmenům sbírkovým, které se lišily zejména u nezávislých kmenů *M. paratuberculosis*. Autoři Whipple aj. (1987) vyšetřili různé druhy a kmeny mykobakterií (*M. paratuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare* a *M. fortuitum*) dvěma restrikčními endonukleázami. Zjistili, že závislé kmeny *M. paratuberculosis* jsou si navzájem velice podobné, zatímco nezávislé kmeny jsou více podobné druhu *M. avium*. Příbuznost druhů *M. avium*, *M. paratuberculosis* a kmenů závislých, izolovaných od holubů, sledovali rovněž Saxegaard a Baess (1988) prostřednictvím DNA-DNA homologie. Kmeny izolované od holubů nazvali jako *M. avium* subsp. *columbae*. Autoři Hurley aj. (1988) metodou DNA-DNA hybridizace zjistili blízkou genetickou příbuznost *M. paratuberculosis*, *M. avium* a závislých kmenů mykobakterií od holubů.

Využití metod molekulární biologie v epizootologii

Závislé kmeny *M. paratuberculosis* představují poměrně homogenní skupinu, kterou není možné biochemicky, sérotypizačně, případně pomocí jiných metod dife-

rencovat. Proto je ověřována metoda DNA fingerprintingu při epizootologickém studiu pro rozlišování jednotlivých kmenů *M. paratuberculosis* (Collins aj., 1986; Whipple aj., 1987; Levy-Frebault aj., 1989; Whipple, 1989, 1990). V práci autorů Collins aj. (1990) jsou kmeny od skotu a malá část kmenů od ovcí a koz řazeny k jedné skupině a kmeny pouze od ovcí a od koz ke druhé skupině. Bylo zjištěno, že např. kmeny od ovcí z jižní Afriky mají stejný RFLP (restriction - fragment - lenght polymorphisms) typ jako kmeny od ovcí z Kanady (DeLisle aj., 1992).

V naší laboratoři byla izolována DNA z 90 dependentních kmenů *M. paratuberculosis* a vyšetřena metodou DNA fingerprintingu. Izoláty pocházely z devíti států ze 30 chovů od 60 kusů skotu (73 kmenů), od 13 ovcí ze tří chovů (15 kmenů), z jednoho chovu koz (jeden kmen) a od člověka (jeden kmen). Na základě RFLP byly zjištěny tři typy kmenů pracovně označené A (37 kmenů), B (51 kmenů) a C (dva kmeny). U kmenů izolovaných z jednoho chovu v průběhu několika let byla zjištěna určitá homogenita. Rovněž v rámci jednotlivých regionů České a Slovenské republiky převládá výskyt kmenů jednoho typu. V jednom chovu se společným chovem skotu a ovcí byl zjištěn stejný typ A. V chovu ovcí v České republice s velkým nákupem a pohybem zvířat byly ve dvouletém období zjištěny typy RFLP A, B a u společně chované kozy byl zjištěn typ C (Pavlík aj., 1994a).

Hematologické vyšetření

Hematologickým vyšetřením pro zjištění výrazné změny určitého parametru se především u skotu zabývali autoři od druhé poloviny 60. let. Allen aj. (1967) zjistili, že v průběhu onemocnění se nemění počet červených a bílých krvinek. Jen v individuálních případech se vyskytl nižší počet erytrocytů se současným snížením obsahu hemoglobinu při normocytóze a zvýšení počtu neutrofilních granulocytů a lymfocytů. U nemocných ovcí zjistili Reddy aj. (1982) signifikantně nižší počet erytrocytů, hemoglobinu a stoupající poměr neutrofilních granulocytů a lymfocytů. Autoři Godu aj. (1982) zaznamenali u koz anémii, leukocytózu a růst poměru neutrofilních granulocytů a lymfocytů.

Při klinické formě onemocnění klesá hladina proteinů v séru (zejména albuminu) rovněž se zvětšujícím se podílem vody ve tkáních (Patterson aj., 1967). Až ve finálním stadiu onemocnění výrazně klesají hladiny draslíku, vápníku, fosforu a hořčíku v séru (Reddy aj., 1982; Gilmore, 1985).

U krav s klinickými příznaky byly slabě zvýšeny hladiny kyselých fosfatázy, aryl-sulfatázy a beta-glukuronidázy a v preklinickém stadiu byla zvýšena hladina sérových glykoproteinů (Patterson aj., 1969). Autoři Kormendi aj. (1990) sledovali parametry 15 ukazatelů v krevním séru infikovaných telat. Zjistili snížené hladiny oproti normálu na konci pokusu u celkového množství proteinů, alkalické fosfatázy, triglyceridů a cholesterolu. Naopak zvýšenou aktivitu zjistili u kreatinkinázy, fruktózo-1,6- difosfát aldolázy, laktát dehydrogenázy, deltahydroxybutyrát de-

hydrogenázy a alanin aminotransferázy, které indikují především poškození kosterní svaloviny, případně jaterní tkáně.

I přes dosažené výsledky se výše zmíněná vyšetření v běžné diagnostice prakticky nepoužívají.

METODY SLEDUJÍCÍ STAV BUNĚČNÉ IMUNITY

Původce paratuberkulózy je typickým představitelem vnitrobuněčného parazita, z čehož vyplývá velký význam buněčné imunity při patogenezi onemocnění (B e n d i x e n , 1978). V počátečním období po infekci *M. paratuberculosis* je významná především buněčná imunitní odpověď, která postupně odeznívá a nastupuje humorální imunita (C h i o d i n i aj., 1984).

Alergické vyšetření

Alergická zkouška je jednou z nejstarších používaných metod k průkazu této nákazy *in vivo*. V průběhu desítek let používání intradermální (ID) aplikace tuberkulinu byly postupně zkoušeny různé postupy (tab. III).

Při ověřování spolehlivosti alergických testů však řada autorů zjistila nespecifické reakce, které snižují citlivost vyšetření. Rovněž záleží na alergenogenních vlastnostech jednotlivých kmenů *M. paratuberculosis* (C h i o d i n i aj., 1984; W e n t i n k aj., 1984; S t e p h e n s , 1987; P a v l a s , 1990a). Při alergickém vyšetření reaguje přibližně 50 až 60 % zvířat, přičemž s pokročilostí procesu onemocnění se počet reagujících zvířat snižuje (K ö r m e n d y aj., 1989). Z 59 zvířat s paratuberkulózou v našich chovech alergicky reagovalo pouze 26,8 % zvířat na aviární tuberkulin a 22,2 % na paratuberkulin (P a v l í k , 1992). V současné době se při plošném vyšetřování skotu na paratuberkulózu alergických testů používá velice málo a někteří autoři jako např. S t e p h e n s (1987) je nedoporučují vůbec.

U ovcí a koz je situace v oblasti alergenodiagnostiky paratuberkulózy odlišná pro obtížnou manipulaci a zpětnou identifikaci zvířat. V Řecku se u ovcí a koz alergenodiagnostika při plošném vyšetření používá v kombinaci s ostatními metodami, jako jsou IDT, KFT a bakterioskopie výkalů (D i m a r e l l i aj., 1991). Vzhledem k pastevnímu chovu ovcí se však na senzibilizaci zvířat pravděpodobně podílí četné atypické mykobakterie zevního prostředí, protože z 93 pozitivně alergických reagentů byla paratuberkulóza prokázána jen u 11,8 % zvířat (P a v l í k , 1992). U ostatních přežvýkavců se tuberkulinace k diagnostice paratuberkulózy prakticky nepoužívá.

Intravenózní (IV) aplikací tuberkulinu připraveného z *M. paratuberculosis* (Johninu) je možné spolehlivost alergického vyšetření zvýšit. L a r s e n a K o p e c k y (1965) a M e r k a l (1973b) zjistili, že po IV aplikaci 2 až 4 ml Johninu je možné měřením zvýšené rektální teploty za 6 h zachytit jak zvířata v subklinickém stavu onemocnění, tak zvířata s klinickými příznaky. F i s c h e r a T e w e s (1989) doporučují u skotu kromě zvýšené rektální teploty upřesnit detekci reagujících zvířat vyšetřením změny leukocytárního krevního obrazu za 12 h po aplikaci a poměr

III. Shrnutí metod intradermální tuberkulinace u přežvýkavců

Autoři	Druh zvířete	Místo inokulace	Dávka tuberkulinu	Koncentrace (TJ nebo mg/ml)	Odečítání (dny)	Pozdní reakce (mm)
DeLisle aj. (1980a)	bo	O	0,1 P		2,3	3
Gilmour a Gardiner (1969)	bo	?	0,1 A	0,5 mg	3	3
Gilmour a Angus (1976)	bo	?	0,1 A	5,5 mg	3	4
Gilmour (1985)	bo	K, O	0,1 A		2,3	3
	bo	K, O	0,1 P		2,3	3
Körmendy a Temesvári (1987)	bo	?	0,1 B	50 000	3	3
Körmendy (1990)	bo	?	0,1 A	25 000	3	3
	bo	?	0,1 P1	0,86 mg	3	3
	bo	?	0,1 P2	0,50 mg	3	3
Kumar aj. (1982)	ov	K	0,2 A		2,3	3
Larsen aj. (1963a)	ov	K	0,2 P		2,3	3
	bo	?	P		2	3
Merkal aj. (1968)	bo	K	0,2 P		2	5
Pavlas (1990b)	bo	K	0,2 A	8 000	3	3
			0,2 P	0,50 mg	3	3

bo - skot

ov - ovce

O - podocasní kožní řasa

K - kůže na straně krku

P - paratuberkulin (Johnin)

A - ptačí tuberkulin

B - savčí tuberkulin

TJ - tuberkulinové jednotky

granulocytů a lymfocytů 2 : 1 hodnotit jako pozitivní. Rovněž u koz autoři Somvanshi aj. (1987) zjistili, že rektální teplota u koz s paratuberkulózou stoupla již za 3 h po aplikaci o 2,0 až 4,1 °C, zatímco v kontrolní skupině u zdravých zvířat jen o 0,8 až 1,8 °C. Změny leukocytárního krevního obrazu byly největší až za 6 h. V praxi se tohoto způsobu tuberkulinace pro jeho pracnost využívá zcela ojediněle, např. při došetřování klinicky nemocných zvířat na veterinárních klinikách.

Ostatní metody

Z dalších metod sledování buněčné imunity *in vitro* byly zkoušeny testy inhibice migrace leukocytů a blastické transformace lymfocytů (TBTL). Jako jedni z prvních

se pokoušeli aplikovat tyto metody Allen aj. (1968). Zjistili, že migrační zóna leukocytů stimulovaných antigenem PPD připraveným z *M. paratuberculosis* byla signifikantně nižší než u zdravých zvířat. Možnost použití TBLT ověřili Alhaj aj. (1974). V chovu skotu s paratuberkulózou zjistili Burgerl aj. (1977) senzitivitu 84 % a specifitu 90 % u zvířat v preklinickém stadiu onemocnění při zjištění nízké reaktivity zvířat s rozvinutými klinickými příznaky.

V posledních několika letech se jeví jako velice nadějná pro diagnostiku paratuberkulózy svojí spolehlivostí detekce gama interferonu uvolněného po stimulaci lymfocytů specifickým antigenem (Johninem). Při diagnostice paratuberkulózy u krav s potvrzenou nákazou byl test pozitivní u 18 z 26 vyšetřených krav s kultivačním průkazem *M. paratuberculosis* v orgánech střevního traktu, přičemž vyšetření sér těchto zvířat ELISA metodou (enzyme linked immunosorbent assay) bylo u 21 pozitivní.

METODY SLEDUJÍCÍ HUMORÁLNÍ IMUNITU

V patogenezi Chiodini aj. (1984) rozlišují první tuberkuloidní stadium, ve kterém dominuje buněčná imunitní odpověď a druhé leproidní stadium, ve kterém hraje důležitou roli především humorální imunita. Velký diagnostický význam má zjištění, že hladina protilátek se objevuje i před počátkem vylučování (Haggsma a Egger, 1988). Proto je možné v současné době považovat za nejperspektivnější sérologickou diagnostiku. Při sérologickém vyšetření je v chovu postačující jen jedna návštěva s odběrem krve.

Komplement fixační test (KFT)

KFT je nejstarším a rovněž nejdéle používaným testem. Bang a Andersen (1913) byli jedni z prvních, kteří ho zkoušeli při diagnostice paratuberkulózy. Hagan a Zeissig (1933) doporučili KFT pro častý výskyt nespecifických reakcí jen u zvířat s klinickými příznaky. Postupně bylo vyzkoušeno mnoho variant provedení KFT týkajících se zejména úpravy sér před vyšetřením, kvantitativních poměrů reagujících složek, hodnocení a interpretace výsledků. V současné době je nejběžnější používání antigenu korpuskulárního (Morris a Stevens, 1977; Abbas aj., 1983). Velmi dobré výsledky však byly získány i s protoplastickým antigenem uvolněným ultrazvukem (Pavlík aj., 1991). Výsledky použití KFT při diagnostice paratuberkulózy skotu jsou uvedeny v tab. IV. Delisle aj. (1980a) zjistili minimální zachytlost KFT u zvířat bez klinických příznaků v případě nepravidelného vylučování. Při pravidelném vylučování potom spolehlivost KFT přímo úměrně závisela na množství vylučovaných mykobakterií.

Při eliminaci paratuberkulózy skotu byl KFT použit v severním Irsku koncem 60. let, kdy se podařilo ozdravit ze 47 infikovaných stád 41 (Rieman a Abbas, 1983). Larsen aj. (1963a) zjistili při pětiletém vyšetřování infikovaného chovu se 161 až 195 zvířaty nestálost hladiny protilátek detekovaných KFT

IV. Komplement fixační test při diagnostice paratuberkulózy skotu

Autoři	Senzitivita		Specifita		Laboratorní došetření zvířat
	n	%	n	%	
skot					
Colgrove aj. (1989)	36	52,8	156	87,2	KO+
Dabadgao a Muley (1987)	42	71,0	349	73,6	KT+
DeLisle aj. (1980a)	37	13,5			KT+
DeLisle aj. (1980b)	30	66,7	423	99,3	KT+
Fischer a Tewes (1989)	17	88,2	206	95,2	KO+kl+
Gilmour a Angus (1976)	26	46,2	100	80,0	KO+
Haagsma a Eger (1988)	139	11,5	518	90,0	KO+kl-
Han a He (1988)	49	57,1	98	92,9	KT+
Jorgensen (1983)	311	86,8	324	71,6	KO+kl+
Karbe (1988)	33	3,0	115	91,3	KT+1
	16	50,0			KT+2
Larsen aj. (1963b)	51	68,6	42	54,8	KT+
	36	63,9		46,0	KO+kl-
	15	80,0			KO+kl+
McNab aj. (1991b)	400	5,5			KT+
Merkal aj. (1968) titr 8	98	71,0	140	73,6	KT+
titr 32	98	45,0		77,0	KT+
Norris a Spencer (1989)	172	74,4	91	92,3	H+
Pavlík aj. (1991)	40	42,5	300	84,0	KO+kl-
	42	81,0			KO+kl+
Ridge aj. (1991)	56	21,4	998	96,9	KO+kl-KT-
	50	57,3			KO+kl-KT+
	136	83,1			KO+kl+
Schaaf aj. (1956)	23	100			KO+kl-
	40	97,5			KO+kl+
Sherman aj. (1990)	74	10,8	154	90,3	KT+
Wilks aj. (1983)	50	84,0			KT+
Yokomizo aj. (1988)	156	26,1			KT+

Autoři	Senzitivita		Specifita		Laboratorní došetření zvířat
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
ostatní přežvýkavci					
Dimarelli - Mali aj. (1991)	81	55,6	75,0	ovce	LT+
	55	39,1	82,6	kozy	LT+
DeLisle a Wall (1983)	37	81,1		ovce	LO+
Milner aj. (1989)	15	80,0	36,0	kozy	LO+
Williams a Snyder (1983)	17	5,9		divoké kozy	LO+

n - počet vyšetřených zvířat

KO - kultivační průkaz původce v orgánech (střevo a příslušné mízní uzliny)

kl - přítomnost klinických příznaků, zejména průjmu

KT - kultivační vyšetření výkalů

KT+1 - izolace do 30 kolonií

KT+2 - izolace více než 30 kolonií

LT - laboratorní vyšetření výkalů

LO - laboratorní vyšetření orgánů (střevo a příslušné mízní uzliny)

zejména u nemocných zvířat. Pro plošné vyšetření se ještě v mnoha státech doporučuje KFT, přestože při jeho použití byl zjištěn výskyt četných nespecifických reakcí, např. při výskytu jiných druhů mykobakterií (Wilks aj., 1981) nebo korynebakterií (McKenzie a Ward, 1981; Pepin aj., 1987).

U malých přežvýkavců se začal KFT ověřovat podstatně později. První informace o používání KFT u ovcí se objevují až na přelomu 40. a 50. let (Hole, 1958). Je zjišťována přibližně stejná senzitivita a specifita jako u skotu (tab. IV). U divokých přežvýkavců tak dobrých výsledků autoři Williams a Snyder (1983) nedosáhli. Ze 132 sér získaných v průběhu 12 měsíců sledování od mláďat různých divokých přežvýkavců (muflon, divoká koza, daněk, jelen, divoká ovce) po umělé infekci *M. paratuberculosis* nezjistili ani v jednom případě pozitivní titr protilátek v KFT. U 17 přirozeně infikovaných divokých koz bylo vyšetření KFT pozitivní pouze u jednoho zvířete. Rovněž Weber a Christoph (1980) zaznamenali při vyšetření divokých přežvýkavců bez paratuberkulózy v jedné honitbě pozitivní reakce v KFT u dvou muflonů z 29, u sedmi srnců z 96 a u šesti jelenů evropských ze 169 vyšetřených.

Testy aglutinace a hemaglutinace (HT)

Při sérologické diagnostice subklinické paratuberkulózy poprvé vyzkoušeli aglutinaci autoři Twort a Ingram (1913) se zjištěním malé specifity a senzitivity. Tohoto vyšetření se od té doby nepoužívá.

Principem hemaglutinačního testu (HT) je reakce antigenu navázaného na povrchu erytrocytů se specifickou protilátkou. Při diagnostice paratuberkulózy byl HT ověřován počátkem 50. let (Gernez - Rieux aj., 1950; Larsen aj., 1953). Merkál aj. (1965) detekovali po vakcinaci jehňat třemi různými antigeny protilátky u všech tří druhů antigenů. Stejně jako později Merkál (1973b) vyslovili autoři pochybnost o možnosti zachytu zvířat v subklinickém stadiu onemocnění. K podobným výsledkům dospěli i Zhāng aj. (1987). Rovněž Goudswaard aj. (1976) srovnáním pěti sérologických metod (HT, HT spojený s lýzí erytrocytů, KFT, FAT a IDT) zjistili největší citlivost FAT a KFT.

Přesto po umělé infekci telat s *M. paratuberculosis* zjistili Huang a Zhāng (1986), že HT zachytil zvířata dříve po infekci než KFT. Pavlas aj. (1989) a Pavlas (1990b) zjistili, že jeho spolehlivost je vysoká (80%) zejména u mladého skotu, přičemž s věkem zvířat a s rozvíjejícím se klinickým onemocněním klesá spolehlivost a specifita.

Test nepřímé imunofluorescence (IFAT)

Principem metody (nazývané také „sendvičová technika“) je průkaz specifických protilátek proti *M. paratuberculosis* v sérologické reakci za použití fluoresceinem značené protilátky proti prokazovaným imunoglobulinům (indirect imunofluorescence test - IFAT).

Jako jeden z prvních použil tuto metodu při diagnostice paratuberkulózy Gilmour (1968) se zjištěním nízké specifity a senzitivity. Po propracování metody se svými spolupracovníky zjistil třikrát vyšší citlivost než KFT, avšak při kolísání hladiny detekovaných protilátek po sobě jdoucích odběrech od uměle infikovaných telat (Gilmour a Gardiner, 1969). Specifita IFAT byla 96 %, zatímco KFT jen 80 %. V dalším vyšetření potvrdili laboratorně nákazu u 26 ze 118 krav, přičemž IFAT byl pozitivní u 16 a KFT jen u 12 infikovaných zvířat (Gilmour a Angus, 1976). Goudswaard aj. (1976) při srovnání několika sérologických metod zjistili vyšší citlivost IFAT v počátečním stadiu onemocnění, zatímco při projevu klinických příznaků byla citlivost srovnatelná s KFT. Abbas aj. (1983) nezjistili ve specifitě a senzitivitě KFT a IFAT žádné signifikantní rozdíly. U koz Paliwal aj. (1984) srovnávali spolehlivost IFAT, alergického vyšetření a vyšetření výkalů. IFAT byl stejně spolehlivý u zvířat všech stupňů klinického onemocnění, zatímco spolehlivost alergického vyšetření s postupujícím onemocněním klesla. Z další práce vyplynulo, že IFAT detekoval 95 % zvířat v preklinickém a všechna zvířata v klinickém stadiu Paliwal aj. (1985). I přes tyto dobré výsledky se test v běžné diagnostické praxi nepoužívá.

Imunodifuzní test (IDT)

Principem testu je tvorba viditelné bílé precipitační linie v místě reakce protilátky a rozpustného antigenu v optimálním množství antigenu, protilátky a solí tvořících

iontové médium. K precipitaci dochází v tekuté části gelového média (agar, agaróza), v němž proti sobě difundují antigen a protilátka (B a c k h a u s z , 1967). Od druhé poloviny 60. let byla zkoušena možnost využití IDT při diagnostice paratuberkulózy, zpočátku s málo uspokojivými výsledky (M e r k a l aj., 1965, 1968, 1975). Výraznější pozornost je IDT věnována až po publikování dalších prací počátkem 80. let, v nichž byla zjištěna vysoká spolehlivost (75 až 99 %) především u zvířat s klinickými příznaky paratuberkulózy při specifitě vyšší než 90 % (S h e r m a n a G e z o n , 1980; S h e r m a n aj., 1983, 1984).

Pod metodické stránce bylo ověřeno mnoho variant postupů. Ve většině prací uvedených v tab. V bylo v rozetě kolem střední jamky s antigenem umístěno 4 až 8 periferních jamek se séry s průměrem 3 až 7 mm ve vzdálenosti 5 až 12 mm. Nejčastěji používaný byl antigen protoplastický, uvolněný ultrazvukem (sonikátor) nebo tlakem (FRENCH PRESS) po přečištění ultracentrifugací a dialýzou. Pro jeho přípravu je nejčastěji použit nezávislý sbírkový kmen, případně jiné většinou nezávislé terénní kmeny *M. paratuberculosis*. Pro velkou příbuznost s *M. avium* S t e p h e n s (1987) doporučuje v metodice pro diagnostiku paratuberkulózy v Austrálii použít i kmene *M. avium*. Vyšetřovaná séra jsou používána téměř ve všech laboratořích koncentrovaná bez další úpravy. K inkubaci trvající až několik dní je dostačující pro odečtení většinou uváděná doba 48 h ve vlhké komůrce při teplotě laboratoře. Především je však nutné dbát na stálost teploty, protože výkyvy v krátké době v rozpětí 10 °C a více mohou být příčinou vzniku nespecifických precipitačních zón, tzv. strií (B a c k h a u s z , 1967).

Agar, příp. agaróza jsou nejčastěji používány v koncentraci 0,75 až 1,5 %. Se stoupající koncentrací agaru se zvyšuje ostrost precipitačních linií, které se však objevují později (B a c k h a u s z , 1967). Průběh precipitace je rovněž ovlivňován pH prostředí. Všeobecně známý fakt zlepšené precipitace v alkalickém prostředí při optimálním pH 9,0 až 10,0 potvrdili M e r k a l aj. (1975). Rovněž však zaznamenali, že zvýšení koncentrace chloridu sodného na 7 až 9 % zapříčinilo vznik nespecifických precipitačních zón i u zvířat neinfikovaných. Při zjišťování vlivu simultánní tuberkulace u skotu na specifitu IDT nebyly potvrzeny žádné nespecifické reakce (P a v l í k , 1992).

Největší pozornost je v současné době věnována možnosti využití IDT u skotu. Jak vyplývá z tab. V řada autorů potvrdila stoupající citlivost testu při rozvíjejícím se klinickém onemocnění. V posledních letech se začal IDT ověřovat při plošném vyšetření u skotu (S i e g e l aj., 1991). Zpráv o úspěšném použití IDT při ozdravování chovu od paratuberkulózy je však poměrně málo. G e z o n aj. (1988) v průběhu tlumení nákazy v chovu koz čítající 100 až 300 zvířat v letech 1974 až 1984 při kombinaci dalších metod (laboratorní vyšetření výkalů, IDT dvakrát ročně a vážení zvířat jednou měsíčně) dosáhli ozdravení v roce 1984 bez zjištění dalšího případu paratuberkulózy v následujících čtyřech letech.

V. Imunodifuzní test při vyšetření skotu, ovcí a koz

Autoři	Antigen	Senzitivita		Specifita		Laboratorní vyšetření zvířat
		n	%	n	%	
skot						
Buergelt aj. (1977)	PPD	65	13,0		100	KO+
Colgrove aj. (1989)	FP	36	27,8	156	96,8	KT+
Fischer a Tewes (1989)	FP	17	47,1	206	100	KO+kl+
Karbe (1988)	EXT	44	75,0	164	95,7	KO+kl+
	EXT	16	37,5			KT+1kl-
	EXT	33	0			KT+3kl-
Körmendy (1990)	EXT	81	14,8			BST+
Lyle a Merkal (1983)	FP	149	7,4			BST-KT+
McNab aj. (1991a)	LAM	22	4,5	378	98,9	KO+
Merkal aj. (1968)	FP	62	56,5	272	56,5	KT+kl-
	FP	36	55,6			KT+kl-
Merkal aj. (1975)	FP	35	85,7			KT+
Pavlík (1992)	SON	46	50,0	300	99,0	KO+kl-
	SON	55	83,6			KO+kl+
Sherman aj. (1984)	FP	33	96,2	18	100	KO+
Sherman aj. (1990)	FP	74	18,9		99,4	KT+
Tsai aj. (1989)	PP	64	17,2			KT+1
	PP	41	58,5			KT+2
	PP	63	75,6			KT+3
	PP	168	48,8			KT+
Valente aj. (1991) hubnutí bez průjmu	PP18	88	11,3	20	100	KT+kl-
	PP18	12	33,3			KT+kl+1
	PP18	32	56,2			KT+kl+2
Woodruff aj. (1991)	PP18	39	64,1			KT+kl-
	PP18	101	54,5			KT+kl+
ovce						
DeLisle a Wall 1983)	SON	25	67,6			LO+
	PREC	26	70,3			LO+
	FP	20	54,1			LO+
Dimarelli-Mali aj. (1991)	FP	81	61,1		82,6	LO+
Garciamarin aj. (1991)	PP3	26	27,0		100	PA+
	PP3	14	0			PA+1
	PP3	4	50,0			PA+2
	PP3	8	63,0			PA+3

Autoři	Antigen	Senzitivita		Specifita		Laboratorní vyšetření zvířat
		n	%	n	%	
Juste aj. (1988)	PP3	31	67,7		100	LO+
Paliwal aj. (1985)	FP	4	25,0			LO+kl-
	F	4	75,0			LO+kl+
Pavlík (1992)	SON	26	46,2	77	51,9	LO+kl-
	SON	24	62,5			LO+kl+
Sugden aj. (1986)	SON.A	22	18,2			LO+
	SPN.D	22	81,8			LO+
kozy						
Dimarelli-Mali aj. (1991)	55	65,2			84,4	LO+
Eamens (1989)	89	61,8				PA+kl-
	114	95,6				PA+kl+
Garciamarin aj. (1991)	PP3	29	55,1		84,6	LO+
Milner aj. (1989)	SON	15	73,0	11	100	LO+
Sherman a Gezon (1980)	FD	40	77,5			KT+
Sherman aj. (1983)	FP	17	47,0			LO+

- n - počet vyšetřených zvířat
 PD - purified protein derivate
 FP - antigen uvolněný tlakem (French Press)
 EXT - antigen získaný extrakcí s KCl
 LAM - lipoarabinomannanový antigen
 PP - protoplazmatický antigen z *M. paratuberculosis*
 PP18 - protoplazmatický antigen z *M. paratuberculosis* (kmen č. 18)
 KO - kultivační průkaz původce v orgánech (střevo a příslušné mízní uzliny)
 kl - přítomnost klinických příznaků, zejména průjmu
 kl+1 - hubnutí bez průjmu
 kl+2 - hubnutí s průjmem
 KT - kultivační vyšetření výkalů
 KT+1 - kultivační vyšetření výkalů pozitivní (několik kolonií)
 KT+2 - kultivační vyšetření výkalů pozitivní (10-100 kolonií)
 KT+3 - kultivační vyšetření výkalů pozitivní (nad 100 kolonií)
 BST - bakterioskopické vyšetření výkalů
 SON - antigen uvolněný sonikací
 SON.A,D - antigen uvolněný sonikací (frakce A, D)
 PREC - antigen získaný precipitací sulfátem sodným
 PP3 - protoplazmatický antigen z *M. paratuberculosis* (kmen č. 3)
 LO - laboratorní vyšetření na paratuberkulózu orgánů (střevo a příslušné mízní uzliny)
 PA - patologicko-anatomické vyšetření
 PA+1 - patologicko-anatomické změny mírné
 PA+2 - patologicko-anatomické změny střední
 PA+3 - patologicko-anatomické změny rozsáhlé

Při průkazu protilátek u skotu proti *M. paratuberculosis* poprvé vyzkoušeli tuto metodu autoři J o r g e n s e n a J e n s e n (1978), kteří použili tepelně extrahovaný antigen *M. paratuberculosis*. V tab. VI a VII jsou uvedeny výsledky použití testu u různých druhů přežvýkavců. Rozdílné výsledky jsou s největší pravděpodobností způsobeny druhem použitého antigenu, příp. dalšími metodickými úpravami (velikost titru, extinkce a další). Největší pozornost je věnována především hledání specifické antigenní frakce vhodné pro diagnostiku, která je komplikována existencí mykobakteriálních antigenů společných jak pro většinu druhů rodu *Mycobacterium*, tak společných i pro další druhy mikroorganismů. To je důvodem pro dosavadní užívání směsí komplexních mykobakteriálních antigenů pro sérologické testy.

Při izolaci antigenů používaných v ELISA metodě převládají práce studující možnost izolace specifické antigenní složky prostřednictvím proteinových profilů sonikovaných mykobakteriálních suspenzí (protoplasma antigen-PPA) rozdělených akrylamidovou elektroforézou (SDS-PAGE). Současně byla potvrzena možnost použití těchto profilů pro identifikaci mykobakteriálních druhů (D e j o n g a j., 1991). Mykobakteriální proteiny separované v SDS-PAGE byly také použity pro stanovení reaktivity sér infikovaných zvířat po elektroforetickém přenosu na nitrocelulózovou membránu za účelem stanovení imunogenity jednotlivých antigenních složek (W h i t e h e a d, 1988 a 1989; V a l e n t i n - W e i g a n d a j., 1991; V e s e l ý a P a v l í k, 1991).

Autoři L e s l i e a j. (1988) zkusili použít i Johnin jako antigen při diagnostice paratuberkulózy u koz (tab. VII), ale dosáhli pouze 29,4% citlivosti testu při specifitě 96,0 %. Několik autorů ověřovalo lipoarabinomananový (LAM) antigen. Dále byly zkoušeny extrakty získané macerací s chloridem draselným (H a a g s m a a E g e r, 1988), případně povrchový antigen (K a r b e, 1988). A b b a s a j. (1983) užili protoplastického antigenu následně čištěného gelovou, ionexovou a afinitní chromatografií u skotu při citlivosti testu 83 % a specifitě 89 %.

Druhým způsobem pro snížení výskytu nespecifických reakcí je preabsorbce vyšetřovaných sér suspenzí *M. phlei*. Jako první ji vyzkoušeli a popsali autoři Y o k o m i z o a j. (1983b, 1985). Později byla preabsorbce použita i jinými autory (tab. VI a VII) a stala se základem pro komerční test. Současně se však objevují práce zpochybňující její výhodnost (T s a i a j., 1989; L o p e z a j., 1990; V a l e n t i n - W e i g a n d a j., 1991) a dokumentující, že preabsorbce dochází spíše ke snížení hladiny protilátek vyšetřovaných vzorků a tím i snížení citlivosti vyšetření. Při srovnání ELISA testu s jinými sérologickými metodami (např. IDT) je zjišťována citlivost o 30 až 40 % vyšší. Stejně jako u jiných sérologických metod (IDT, KFT) je zřejmé, že spolehlivost testu stoupá se stupněm klinických příznaků. Specifita testu je poměrně dobrá a průměrně se pohybuje mezi 80 až 95 %, zhoršuje se však v chovech s výskytem nespecifických alergických reakcí. Při zjišťování vlivu simultánní tuberkulózy u skotu na ELISA vyšetření byly zjištěny první až třetí týden po tuberku-

linaci nespecifické reakce. Je proto nutné přizpůsobit odběr vzorků krve na vyšetření nejdříve za 4 až 6 týdnů po tuberkulinaci (P a v l í k , 1992).

Collins a Nordlund (1991) vyšetřovali v jednom chovu všechna zvířata (678 kusů) starší 20 měsíců ELISA testem bez vyřazování pozitivních reagentů (47), které pouze evidovali a sledovali u nich mléčnou produkci. Prokázali u nich nižší produkci mléka (průměrně o 5,4 %), která byla beze změn po první a druhé laktaci, ale jasně se snížila ve třetí a dalších laktacích. U každé další laktace odhadli ztráty u jedné krávy přes 200 USD. Autoři Yokomizoj. (1988) navrhli při plošném vyšetřování skotu na výskyt paratuberkulózy nahradit KFT v Japonsku právě ELISA testem. Použití ELISA testu k plošnému vyšetření v jiných zemích však není zatím příliš rozšířeno.

Ostatní metody sérologické diagnostiky

Metoda křížové imunoelktroforetické analýzy je využívána především při studiu antigenů používaných při různých sérologických metodách. Collins aj. (1991) zjistili pomocí této metody křížovou reaktivitu antigenů *M. paratuberculosis*, *M. avium* a částečně *M. phlei*. Rovněž porovnali různé komerční antigeny pro KFT, ELISA a IDT.

Metoda vstřícné imunoelktroforézy byla u skotu téměř čtyřikrát citlivější než IDT (M u h a m m e d , 1978). U ovcí ji ověřovali v Íránu a Libyi M u h a m m e d a I v o g h l i (1983). Collins aj. (1984) a P a l i w a l aj. (1985) rovněž zjistili velkou spolehlivost u zvířat s klinickými příznaky.

Princip testu nepřímé imunoperoxidázy spočívá v průkazu sérových protilátek pomocí antigenu a konjugované protilátky proti imunoglobulinům skotu, kterými se detekuje vazba antigenu a protilátky ve vyšetřovaném vzorku séra. Autoři B u e r g e l t a N g u y e n (1983) a N g u y e n a B u e r g e l t (1983) popsali výše zmíněnou metodu při diagnostice paratuberkulózy skotu s jednoduše připraveným antigenem v histologickém preparátu. Jako konjugátu bylo použito hyperimunního séra kozy proti imunoglobulinům krávy. Při pozitivní reakci se v cytoplasmě makrofágů v lamina propria a v submukóze uložila hnědá granula vzniklá tvorbou polymeru fenazinu.

W o r s a a e (1978) použil sérologickou metodu RIA (radioimmunoassay) k detekci protilátek antigenem PPD připraveným z *M. paratuberculosis* a značeným radioaktivním ¹²⁵I. Test vykazoval vysokou citlivost (97 %) při specifitě 74 %. Přes rychlost vyšetření (do 8 h) a možnost analýzy až 50 vzorků sér denně se tato metoda v diagnostické praxi běžně nepoužívá.

DETEKCE PROTILÁTEK V OBSAHU STŘEVNÍM, MLÉCE A KOLOSTRU

Detekce protilátek ve výše zmíněném materiálu se provádí jen ojediněle. Při studiu patogeneze paratuberkulózy ovcí autoři M u h a m m e d a I v o g h l i (1980) sledovali přítomnost protilátek v obsahu střevním u ovcí s potvrzenou paratuberku-

VI. Sérologické vyšetření skotu metodou ELISA

Autoři	X	Antigen	Senzitivita		Specifita		Laboratorní vyšetření zvířat
			n	%	n	%	
Abbas aj. (1983)	?	PPpurif		89,0		83,0	KO+
	?	PPnepurif		59,0		62,0	KO+
Colgrove aj. (1989)	?		36	77,8	156	73,3	KT+
Cox aj. (1991a)	?	SON	40	65,0			KT+kl-
Cox aj. (1991b)	?	SON	57	79,0	997	99,8	KO+kl+
Haagsma a Eger (1988)	?		37	67,6	137	32,0	KO+kl-
Han a He (1988)	+	SON	49	93,9	99	97,0	KT+
Jorge (1988)	-	SON		79,5		90,9	KO+
Karbe (1988)	-	EXT	26	88,5			KO+kl+
	-	EXT	49	38,8	115	44,3	KT+kl-
	-	EXT	20	15,0			KT+1
	-	EXT	13	30,8			KT+2
	-	EXT	4	50,0			KT+3
	-	EXT	12	83,3			KT+4
Lopez aj. (1990)	?	PP*	31	38,7	56	71,4	KO+ch+
	?	PP			46	87,0	KO-ch-
McNab aj. (1991a)	?	LAM		49,0		87,0	KT+
Milner aj. (1989)	+	SON	52	55,8	275	98,6	KT+
Pavlík aj. (1991)	-	SON	40	62,5	300	83,7	KO+kl-
	-	SON	42	81,6			KO+kl+
Ridge aj. (1991) USA		+	PP	150	52,0	196	99,8
Austrálie	+	PP	43	48,8	998	99,8	KT+
Austrálie	+	PP		59,7		57,3	KT+kl-
Austrálie	+	PP		88,2		83,4	KT+kl-
Rieman a Abbas (1983)	?	FPpurif	60	61,7	44	59,1	KO+kl-
	?	FPnepur	60	83,3	44	88,6	KO+kl-
Sugden aj. (1991)	+			70,8		97,3	KO+
	-					90,7	KO+
Tsai aj. (1989)	?	PP18	168	65,5	161	85,7	KT+kl-
Valente aj. (1991)	-	SON	88	7,9	20	90,0	KT+kl-
	-	SON	12	66,6	hubnutí		KT+kl-

Autoři	X	Antigen	Senzitivita		Specifita		Laboratorní vyšetření zvířat
			n	%	n	%	
Wood aj. (1988)	-	SON	32	81,2	48	79,2	KT+kl+
	+	SON	19	73,7			KT+kl-
	+	SON	14	85,7			KO+kl+
Wood aj. (1989)	+	SON	53	69,8			KO+
	+	SON	39	69,2			KT+
	+	SON	11	54,6			KT+kl-
	+	SON	15	86,7			KT+kl+
Wood (1991)	-	SON		16,0	669	83,6	KO+kl-
	-	SON		40,0			KT-
	-	SON		77,0			KO+kl- KT+
Woodruff aj. (1991)	?	PP18	39	64,1			KO+kl+KT +
	?	PP18	99	79,8			KT+
Yokomizo aj. (1983a)	+	SON	62	57,6			KO+kl+
Yokomizo aj. (1988)	+	FP	156	80,8	3880	99,9	KO+
	+	FP	alerg. reagenti 75			61,3	KO-

X - preabsorbce s *M. phlei*

n - počet vyšetřených zvířat

SON - antigen uvolněný sonikací

PPA - protoplazmatický antigen z *M. paratuberculosis*PP18 - protoplazmatický antigen z *M. paratuberculosis* (kmen č. 18)PPA* - protoplazmatický antigen z *M. paratuberculosis* (připravený ve vlastní laboratoři)

FP - antigen uvolněný tlakem (French Press)

EXT - antigen získaný extrakcí s KCl

LAM - lipoarabinomannanový antigen

KO - kultivační průkaz původu v orgánech (střevo a příslušné mízní uzliny)

kl - přítomnost klinických příznaků, zejména průjmu

KT - kultivační vyšetření výkalů

KT+1 - izolace 1 - 3 kolonií v 1 g výkalů

KT+2 - izolace 4 - 30 kolonií v 1 g výkalů

KT+3 - izolace 31 - 300 kolonií v 1 g výkalů

KT+4 - izolace více než 300 kolonií v 1 g výkalů

ch - výskyt paratuberkulózy v chovu

PA - patologicko-anatomické vyšetření

VII. Sérologické vyšetření ovcí a koz metodou ELISA

Autoři	X	Antigen	Senzitivita		Specifita		Laboratorní vyšetření zvířat
			n	%	n	%	
ovce							
Dimarelli- Mali aj. (1991)	?		81	83,3		87,0	L+
Juste aj. (1988)	+	PP3	21	74,1		90,9	L+
Sugden aj. (1988)	?	SONA	22	81,8			L+
	?	SONA	22	100			L+
	?	LAM	22	72,7			L+
Valentin- Weigand aj. (1991)	-	SON	15	80,0			L+kl+
	+	SON	15	46,7			L+kl+
kozy							
Dimareli- Mali aj. (1991)	?		55	87,0		90,6	L+
Garciamarin aj. (1991)	?	PP3		65,5		84,0	PA+
	?	PP3		50,0			PA+1
	?	PP3		64,0			PA+2
	?	PP3		100			PA+3
Leslie aj. (1988)	?	PPD	51	29,4	917	96,0	KT+kl
Milner aj. (1989)	+	SON	15	86,7	11	100	L+kl-
Molina aj. (1990)	-	SON	17	82,4	63	93,7	L+kl-
	+	SON	17	82,4	63	95,2	L+kl-
	?	SON			9	77,8	L+TBC+
	-	PP3	17	88,2	63	95,2	L+kl-
	+	PP3	17	64,7	63	96,8	L+kl-
	?	SON			9	77,8	L-TBC+
Sugden aj. (1988)	?	SON.A	16	6,3			L+
	?	SON.A	16	6,3			L+
	?	SON.A	16	68,8			L+

X - preabsorbce s *M. phlei*

n - počet vyšetřených zvířat

SON - antigen uvolněný sonikací

SON.A - antigen uvolněný sonikací (frakce A)

PP3 - protoplazmatický antigen z *M. paratuberculosis* (kmen č. 3)

LAM - lipoarabinomananový antigen

PPD	- purified protein derivate
L	- laboratorní vyšetření na paratuberkulózu
kl	- přítomnost klinických příznaků, zejména průjmu
KT	- kultivační vyšetření výkalů
PA+1	- patologicko-anatomické změny mírné
PA+2	- patologicko-anatomické změny střední
PA+3	- patologicko-anatomické změny rozsáhlé
TBC+	- infekce <i>M. bovis</i>

lózou metodou vstřícné imuno elektroforézy. Z osmi ovci s klinickými příznaky zjistili protilátky ve střeVNím obsahu u šesti. L a r s e n aj. (1963b) pomocí KFT zjistili u telat po příjmu kolostra od krav nakažených paratuberkulózou vysoké hladiny protilátek, které postupně vymizely. V kolostru ovci pocházejících z chovu s výskytem paratuberkulózy dosáhli stejných výsledků M u h a m m e d a E l i a s s o n (1979). R i c h a r d s (1990) sledoval u skotu výskyt protilátek v mléce modifikovanou metodou ELISA, kterou nazval MELISA. Při srovnání vyšetřených krav s klinickými příznaky paratuberkulózy zjistil přibližně stejné hladiny protilátek jak v séru tak v mléce. Stejně jako jiné metody intravitální diagnostiky není ani MELISA využitelná při diagnostice paratuberkulózy u krav vakcinovaných. Při epizootologické depistáži by však bylo možné vyšetřením vzorku mléka z chladicího tanku odhalit chovy skotu s paratuberkulózou. S w e e n e y aj. (1991) potvrdili ELISA metodou v séru stejně jako v mléce krav s kultivačním průkazem *M. paratuberculosis* ve výkalech vyšší titr protilátek než u krav s negativní kultivací výkalů.

DIFERENCIÁLNÍ DIAGNOSTIKA

Klinické příznaky u skotu podobné paratuberkulóze (průjem, vyhublost aj.) mohou být způsobeny i jinými příčinami. Nejčastěji jsou uváděny parazitózy (jaterní motolice, střeVNí oblí červi), chronická salmonelóza, chronická forma BVD, leukóza, traumatické onemocnění předžaludků a jater, amyloidní nefróza a další (K l e e , 1987; T o n t i s , 1989). Autoři R i n g s a G a r r y (1988) uvádějí dokonce i spojitost mezi paratuberkulózou a amyloidózou ovci. Vyslovili předpoklad, že *M. paratuberculosis* může mít stejně jako jiné mykobakterie schopnost vyvolat produkci amyloidu. Kromě výše zmíněných onemocnění uvádí H i n e s aj. (1987) i pyelonefritidu a lymfosarkomatózu.

S u m m e r s (1981) se zmiňuje o průkazu *M. paratuberculosis* jen u 22 % klinicky podezřelých krav pocházejících z nakaženého chovu. G i l m o u r (1976) zjistil příznaky průjmu u krav s paratuberkulózou jen u 63,6 % zvířat s příznaky hubnutí, přičemž paratuberkulóza byla prokázána jen u 32 % krav z 207 vyšetřených hubnoucích zvířat. Ve skupině 141 hubnoucích krav z chovů nákazy prostých byl průjem jiného původu zjištěn pouze u 14,2 % zvířat. V našich podmínkách byla paratuberkulóza v nakaženém chovu potvrzena ze 159 krav s příznaky průjmu a vy-

hublosti u 68,6 % zvířat a z 50 ovcí s příznaky vyhublosti a apatie u 56,8 % zvířat (Pavlík, 1992).

U ovcí se příznaky postupného hubnutí s případným výskytem průjmu objevují u celé řady jiných onemocnění jako jsou střevní parazitózy, chronické bakteriální infekce a další (Hole, 1958). Autor Gumbrel (1986b) zjistil při vyšetření 2 069 ovcí z chovů s paratuberkulózou s výše uvedenými příznaky jen u 23 % paratuberkulózu, u 10 % střevní parazitózu, u 9 % salmonelózu a u 13 % jiné příčiny. Plných 45 % případů zůstalo neobjasněných.

Pro potvrzení diagnózy je v současné době nutné při běžné diagnostické praxi bakteriologické vyšetření s mikroskopickým (typické shluky AST) nebo kultivačním průkazem původce. Stanovení diagnózy jen na základě klinických příznaků, sérologického vyšetření (pozitivní reakce), případně patologicko-morfologických změn není postačující, protože může dojít k omylům.

Poděkování

Dovolujeme si poděkovat MVDr. ing. V. Štikovi a MVDr. P. Kalenskému za cenné připomínky a ing. Z. Rozsypalové, ing. V. Čermákové a spolupracovníkům z knihovny Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně za technickou pomoc.

Literatura

- ABBAS, B.: Diagnosis of Johne's disease (paratuberculosis) in cattle with emphasis on serological methods. Diss. Abstr. Int., Sect. B, 44, 1983: 1372.
- ALHAJI, I. - JOHNSON, D. W. - MUSCOPLAT, C. C. - THOEN, C. O.: Diagnosis of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium paratuberculosis* infections in cattle by *in vitro* lymphocytes immunostimulation. Amer. J. Vet. Res., 35, 1974: 725-727.
- ALLEN, W. - BERRETT, S. - PATTERSON, D.: A haematological study of clinical cases of Johne's disease and the assesment of an intravenous Johnin diagnostic test. J. Comp. Path., 77, 1967: 71-79.
- ALLEN, W. - HEBERT, C. N. - PATTERSON, D.: *In vitro* studies of leukocyte migration in cattle infected with *Mycobacterium johnei*. Tubercle, London, 49, 1968: 397-403.
- AMADO, A. - MARIANO, I.: Johne's disease in cattle in Portugal. Paratuberculosis Newsletter, 3, 1991: 27.
- ARRIGONI, N. - BELLETI, G. L. - COLOMBI, R. - DARAGONA, G. M. - ZANARDELLI, M.: Bovine paratuberculosis: observations on the epidemiology in the PQ Valley (North Italy). Attempts of control in the district of Piacenza. In: 2nd Int. Colloq. on Paratuberculosis in Maisons-Alfort Cedex, Laboratoire central de recherches veterinaires 1988: 18-24.
- BACKHAUSZ, R.: Immunodiffusion und Immunoelktrophorese Grundlagen, Methoden und Ergebnisse. 1. ed. Jena, VEB Gustav Fischer Verlag 1967. 516 s.
- BANG, B.: Chronische pseudotuberkulöse Darmentzündung beim Rinde. Berl. Münch. tierärztl. Wschr., 42, 1906: 759-753.

- BANG, O. - ANDERSEN, C. W.: Einige Untersuchungen über komplement-bindende Antistoffe bei experimenteller und spontaner Tuberkulose sowie bei paratuberkulöser Darmentzündung. Ztbl. Bakt. Parasitkde Infektionskrank. Hyg. Abt. 1, R. A, 69, 1913: 517-538.
- BEERWERTH, W.: Die Züchtung von Mykobakterien aus dem Kot der Haustiere und ihre Bedeutung für die Epidemiologie und Bekämpfung der Tuberkulose. Prax. Pneumol. Tuberkul., 21, 1967: 189-202.
- BENDIXEN, P. H.: Immunological reactions caused by infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. Nord. Vet.-Med., 30, 1978: 163-168.
- BENDIXEN, P. H. - BLOCH, B. - JORGENSEN, J. B.: Lack of intracellular degradation of *Mycobacterium paratuberculosis* by bovine macrophages infected *in vitro* and *in vivo*: light microscopic and electron microscopic observations. Amer. J. Vet. Res., 42, 1981: 109-113.
- BENEDICTUS, G.: Bovine paratuberculosis. Pro Veterinario, 1987: 1-2.
- BENEDICTUS, G. - DIJKSTRA, R. G. - HAAGSMA, J.: Observations on diagnostic tests for paratuberculosis. Proc. Gec-Workshop, Kopenhagen, 1983: 43-59.
- BENEDICTUS, G. - HAAGSMA, J.: The efficacy of mesenteric lymph node biopsy in the eradication of paratuberculosis from infected dairy farm. Vet. Quart., 8, 1986: 5-11.
- BENSCH, H.: Kulturelle Untersuchungen zur Paratuberkulose-Diagnostik mit besonderer Berücksichtigung der epidemiologischen Bedeutung schwacher Ausscheider. [Inaugural-Dissertation.] Hannover 1993. 155 s. - Tierärztliche Hochschule Hannover. Institut für tierärztliche Nahrungsmittelkunde.
- BERNARDELLI, A.: Paratuberculosis en cabras. Revta Med. Vet., 68, 1987: 92-96.
- BRUGÈRE-PICOUX, J. - MARET, J. F. - COTTEREAU, P.: Enquete sur les moyens mis en oeuvre pour lutter contre la paratuberculose des ruminants en France. In: 2nd Int. Colloq. on Paratuberculosis in Maisons-Alfort Cedex, Laboratoire central de recherches veterinaires 1988: 293-297.
- BUERGELT, C. D. - NGUEN, H. T.: Indirect immunoperoxidase test for the diagnosis of paratuberculosis. In: Proc. Int. Colloq. on Research in paratuberculosis, AMES, Iowa, June 16-18, 1983: 180-181.
- BUERGELT, C. D. - HALL, C. H. E. - MERKAL, R. S. - WHITLOCK, R. H. - DUNCAN, J. R.: Lymphocyte transformation: an aid in the diagnosis of paratuberculosis. Amer. J. Vet. Res., 38, 1977: 1709-1715.
- BUERGELT, C. D. - HALL, C. - MCENTEE, K. - DUNCAN, J. R.: Pathological evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle. Vet. Pathol., 15, 1978: 196-207.
- BURNHAM, W. R. - LENNARD-JONES, J. E.: Mycobacteria as a possible cause of inflammatory bowel disease. Lancet, 1978: 693-696.
- CARRIGAN, M. J. - SEAMAN, J. T.: The pathology of Johne's disease in sheep. Austral. Vet. J., 67, 1990: 47-50.
- COLGROVE, G. S. - THOEN, C. O. - BLACKBURN, B. O. - MURPHY, C. D.: Paratuberculosis in cattle: a comparison of three serologic tests with results of fecal culture. Vet. Microbiol., 19, 1989: 183 -189.
- COLLINS, P. - DAVIES, D. C. - MATTHEWS, P. R. J.: Mycobacterial infection in goats: diagnosis and pathogenicity of the organism. Brit. Vet. J., 140, 1984: 196-201.
- COLLINS, D. M. - DeLISLE, G. W.: Restriction endonuclease analysis of various strains of *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from cattle. Amer. J. Vet. Res., 47, 1986: 2226-2229.
- COLLINS, D. M. - GABRIC, D. M. - DeLISLE, G. W.: Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. Clin. Microbiol., 28, 1990: 1591-1596.

- COLLINS, M. T. - McLAUGHLIN, A. R.: Experience in Wisconsin in control and accreditation of Johne's disease infected herds. In: Proc. Conf. Vet. Res. Inst., Parkville, Victoria, Australia, CSIRO 1989: 67-73.
- COLLINS, M. T. - NORDLUND, K. V.: Milk production levels in cows ELISA positive for serum antibodies to *Mycobacterium paratuberculosis*. Paratuberculosis Newsletter, 3, 1991: 27.
- COLLINS, M. T. - HOIBY, N. - JORGENSEN, J. B. - BERCOVIER, H. - LAMBRECHT, R. S. - JORGENSEN, E.: Crossed immunoelectrophoretic analysis of *Mycobacterium paratuberculosis*. APMIS, 99, 1991: 83-92.
- COX, J. C. - DRANE, D. P. - JONES, S. L. - RIDGE, S. - MILNER, A. R.: Evaluation of a rapid absorbed EIA for the diagnosis of paratuberculosis in cattle. Paratuberculosis Newsletter, 3, 1991a: 10-11.
- COX, J. C. - DRANE, D. P. - JONES, S. L. - RIDGE, S. - MILNER, A. R.: Development and evaluation of a rapid absorbed disease in cattle. Austral. Vet. J., 68, 1991b: 157-160.
- CUNNINGHAM, M. P. - GILMOUR, N. J. L.: A new method of preparing smears of bovine faeces for microscopical examination in the diagnosis of Johne's disease. Vet. Rec., 71, 1959: 47-49.
- DABADGAO, S. D. - MULEY, A. R.: Complement fixation test in the diagnosis of Johne's disease in cattle. Indian J. Vet. Med., 7, 1987: 148-149.
- DAMATO, J. J. - KNISLEY, C. - COLLINS, M. T.: Characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* by gasliquid and rapid demonstration of mycobactin dependence using radiometric methods. J. Clin. Microbiol., 25, 1987: 2380-2383.
- DAVID, C. - BONNIER, M.: Experimental diagnosis of paratuberculosis in cattle. Point Vet., 18, 1986: 215-217.
- DEJONG, A. - HONTSEN, A. H. - VANDERZANDEN, A. G. M.: A rapid method for identification of *Mycobacterium species* by polyacrylamide gel electrophoresis of soluble cell proteins. J. Med. Microbiol., 34, 1991: 1-7.
- DeLISLE, G. W. - COLLINS, D. M. - HUCHZERMAYER, H. A. K.: Characterization of ovine strains of *Mycobacterium paratuberculosis* by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. Onderstepoort J. Vet. Res., 59, 1992: 163-165.
- DeLISLE, G. W. - SAMAGH, B. S. - DUNCAN, J. R.: Bovine paratuberculosis. II. A comparison of fecal culture and the antibody response. Can. J. Comp. Med., 44, 1980b: 183-191.
- DeLISLE, G. W. - WALL, E. P.: Serological test for detection Johne's disease in sheep. In: Proc. Int. Colloq. on Research in Paratuberculosis, AMES, Iowa, June 16-18, 1983: 113-119.
- DeLISLE, G. W. - SEGUIN, P. - SAMAGH, B. S. - CORNER, A. H. - DUNCAN, J. R.: Bovine paratuberculosis. I. A herd study using complement fixation and intradermal tests. Can. J. Comp. Med., 44, 1980a: 177-182.
- DIMARELLI-MALI, Z. - SARRIS, K. - XENOS, G. - PAPADOPOULOS, G.: Comparison of the ELISA, AGID and CF tests for diagnosis of caprine and ovine paratuberculosis. Paratuberculosis Newsletter, 3, 1991: 32.
- DIMARELLI, Z. - XENOS, G. - ARGYROUDIS, S. - PAPADOPOULOS, O.: A survey of ovine and caprine paratuberculosis in the Thessaloniki area, Greece. Paratuberculosis Newsletter, 3, 1991: 8-9.
- DOYLE, T. M.: Isolation of Johne's bacilli from the udders of clinically affected cows. Brit. Vet. J., 110, 1954: 215-218.
- EAMENS, G. J.: Johne's disease in goats. In: Proc. Conf. Vet. Res. Inst., Parkville, Victoria, Australia, CSIRO 1989: 105-112.

- EVERETT, R. E. - NORTH, R. N. - OTTAWAY, S. J. - SCOTT-ORR, H.: The status of Johne's disease in New South Wales. In: Proc. Conf. Vet. Res. Inst., Parkville, Victoria, Australia, CSIRO 1989: 14-18.
- FINN, M. - GUNNARSON, E.: Post-mortem examination in the diagnosis of Johne's disease in goats. Acta Vet. Scand., 20, 1979: 157-167.
- FISCHER, W. - TEWES, S.: Beitrag zur Diagnostik der Paratuberkulose des Rindes. Tierärztl. Umsch., 44, 1989: 25-30.
- FRANCIS, J. - MACTURK, H. M. - MADINAVEITA, J. - SNOW, G. A.: Mycobactin, a growth factor for *Mycobacterium johnei* I. Isolation from *Mycobacterium phlei*. Biochem. J., 55, 1953: 596-607.
- GAHLOT, A. K.: Current status of paratuberculosis in India - a report. Paratuberculosis Newsletter, 3, 1991: 37.
- GARCIMARIN, J. F. - PEREZ, V. - BADIOLA, J. J.: Prevalence and type of paratuberculosis lesions in sheep and their relation with the diagnosis by AGID test. Paratuberculosis Newsletter, 3, 1991: 22.
- GERNEZ-RIEUX, C. - PACQUET, A. - GAUMONT, R. - VERGE, J. - CAUCHI, L.: La reaction hemagglutination (Reaction de Middlebrook-Dubos) dans la paratuberculose bovine. Bull. Acad. Vet. France, 23, 1950: 465-468.
- GEZON, H. M. - BITHER, H. D. - GIBBS, H. C. - ACKER, E. J. - HANSON, L. A. - THOMPSON, J. K. - JORGENSEN, R. D.: Identification and control of paratuberculosis in a large goat herd. Amer. J. Vet. Res., 49, 1988: 1817-1823.
- GILMOUR, N. J. L.: The detection of antibodies to *Mycobacterium johnei* by immunofluorescence. Proc. Ann. Meet US Livestock San. Assoc., 1968: 173-181.
- GILMOUR, N. J. L.: Diagnosis and control of Johne's disease. Vet. Rec., 99, 1976: 433-434.
- GILMOUR, N. J. L.: *Mycobacterium paratuberculosis*. In: MEISSNER, G. aj.: Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, Band V. Jena, VEB Gustav Fischer Verlag 1985: 281-313.
- GILMOUR, N. J. L.: Paratuberculosis. In: Management and health of farmed deer, Edinburgh, 1987: 1113-1119.
- GILMOUR, N. J. L. - ANGUS, K. W.: The specificity and sensitivity of the fluorescent antibody test for *Mycobacterium johnei* infection in abattoir and culled cattle. Res. Vet. Sci., 20, 1976: 10-12.
- GILMOUR, N. J. L. - GARDINER, A. C.: Fluorescent-antibody test in preclinical experimental *Mycobacterium johnei* infection in cattle. J. Comp. Path., 79, 1969: 71-77.
- GITNICK, G.: Preliminary report on isolation of Mycobacteria from patients with Crohn's disease. Digest. Dis. Sci., 34, 1989: 925-933.
- GODU, J. - GUERRAULT, B. - VERGER, J.M.: Paratuberculosis in the goat: problems in diagnosis. Bull. Group. Tech. Vet., 1982: 53-60.
- GOUDSWAARD, J. - GILMOUR, N. J. L. - DIGKSTRA, R. G.: Diagnosis of Johne's disease in cattle: A comparison of five serologic tests under field conditions. Vet. Res., 98, 1976: 461-462.
- GRAHAM, D. Y. - MARKESICH, D. C. - YOSHIMURA, H. H.: Mycobacteria and inflammatory bowel disease. Results of culture. Gastroenterology, 92, 1987: 436-442.
- GREEN, E. P. - TIZARD, M. L. - MOSS, M. T. - THOMPSON, J. - WINTERBOURNE, D. J. - McFADDEN, J. J. - HERMON-TAYLOR, J.: Sequence and characteristic of IS 900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. Nucl. Acid. Res., 17, 1989: 9063-9087.
- GRIFFIN, J. F. T.: The etiology of tuberculosis and mycobacterial disease in farmed deer. Ir. Vet. J., 42, 1988: 23-28.

- GUMBRELL, R. C.: Johne's disease in deer. *Surveillance, N. Z.*, 13, 1986a: 15-16.
- GUMBRELL, R. C.: The history and current status of ovine Johne's disease in New Zealand. *Proc. of Health Beef Cattle*, 16, 1986b: 173-184.
- HAAGSMA, J. - EGER, A.: Bovine paratuberculosis: improvement in the diagnosis of subclinical infected animals. In: 2nd Int. Colloq. on Paratuberculosis in Maisons-Alfort Cedex, Laboratoire central de recherches vétérinaires 1988: 189-200.
- HAGAN, W. A.: Age as a factor in susceptibility to Johne's disease. *Cornell vet. J.*, 28, 1938: 34-40.
- HAGAN, W. A. - ZEISSIG, A.: Studies on the control of Johne's disease. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.*, 82, 1933: 391-407.
- HAN, Y. - HE, Z.: Some research on paratuberculosis in our department during several years. In: 2nd Int. Colloq. on Paratuberculosis in Maisons-Alfort Cedex, Laboratoire central de recherches vétérinaires 1988: 146-149.
- HANZLÍKOVÁ, M.: Metóda komplexnej laboratórnej diagnostiky paratuberkulózy zvierat. *Nitra, ŠVÚ* 1988: 1-22.
- HANZLÍKOVÁ, M. - VILÍMEK, L.: Výskyt paratuberkulózy u hovädzieho dobytku v SSR v rokoch 1982-1987. *Veterinářství*, 39, 1989: 462-463.
- HARDING, H. P.: Experimental infection with *M. johnei*. II. Histopathology of infection in experimental goats. *J. Comp. Pathol. Therapy*, 67, 1957: 37-52.
- HINES, S. A. - BUERGELT, C. D. - WILSON, J. H. - BLISS, E. L.: Disseminated *Mycobacterium paratuberculosis* infection in a cow. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.*, 190, 1987: 681-683.
- HOFFSIS, G. F.: The current status of clinical diagnosis of Johne's disease. In: *Proc. Int. Colloq. on Research in Paratuberculosis*, AMES, Iowa, June 16-18, 1983: 2-7.
- HOLE, N. H.: Johne's disease. *Adv. Vet. Sci.*, 4, 1958: 341-387.
- HOLE, N. H. - MACCLAY, M. A.: The diagnosis of Johne's disease in cattle and the identification of *M. johnei* infection. *Vet. Rec.*, 71, 1959: 1145-1149.
- HUANG, Z. L. - ZHANG, Z. H.: Relationship between immunological diagnosis and immunopathomorphology in paratuberculosis of cattle. *Chin. J. Vet. Sci. Technol.*, 1986: 15-18.
- HURLEY, S. S. - SPLITTER, G. A. - WELCH, R. A.: Deoxyribonucleic acid relatedness of *Mycobacterium paratuberculosis* to other members of the family Mycobacteriaceae. *Int. J. Systematic Bact.*, 38, 1988: 143-146.
- HURLEY, S. S. - SPLITTER, G. A. - WELCH, R. A.: Development of a diagnostic test for Johne's disease using a DNA hybridization probe. *J. Clin. Microbiol.*, 27, 1989: 1582-1587.
- CHALLANS, J. - STEVENSON, K. - REID, H. W. - SHARP, J. M.: A rapid method for the extraction and amplification of *M. paratuberculosis* DNA from clinical specimens. *Paratuberculosis Newsletter*, 3, 1991: 27.
- CHIODINI, R. J.: Biochemical characteristics of various strains of *M. paratuberculosis*. *Amer. J. Vet. Res.*, 47, 1986: 1442-1445.
- CHIODINI, R. J.: Crohn's disease and the Mycobacteriosis: a review and comparison of two disease entities. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2, 1989: 90-117.
- CHIODINI, R. J. - VanKRUININGEN, H. J.: The prevalence of paratuberculosis in culled New England cattle. *Cornell. Vet.*, 76, 1986: 91-104.
- CHIODINI, R. J. - VanKRUININGEN, H. J. - MERKAL, R. S.: Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell Vet.*, 74, 1984: 218-262.
- CHO, S. N. - BRENNAN, P. J. - YOSHIMURA, H. H. - KORELITZ, B. I. - GRAHAM, D. Y.: Mycobacterial aetiology of Crohn's disease: serologic study using common mycobacterial

- antigens and a species-specific glycolipid antigen from *Mycobacterium paratuberculosis*. Gut, 27, 1986: 1353-1356.
- JOHNE, H. A. - FROTHINGHAM, L.: Ein eigenthümlicher Fall von Tuberkulose beim Rind. Dtsch. Ztschr. Tiermed., 21, 1895: 438-454.
- JONES, R. L.: Review of recent research studies in the United States related to Johne's disease with emphasis on diagnosis and control of the disease. In: Proc. Conf. Vet. Res. Inst., Parkville, Victoria, Australia, CSIRO 1989a: 1-8.
- JONES, R. L.: Review of the economic impact of Johne's disease in the United States. In: Proc. Conf. Vet. Res. Inst., Parkville, Victoria, Australia, CSIRO 1989b: 46-50.
- JORGE, M. C.: Serological studies on Johne's disease in a dairy herd by ELISA during a three years period. In: 2nd Int. Colloq. on Paratuberculosis in Maisons-Alfort Cedex, Laboratoire central de recherches vétérinaires 1988: 52-57.
- JORGENSEN, J. B.: Studies of the incidence of paratuberculosis in cattle in Denmark. Nord. Vet.-Med., 24, 1972: 197-308.
- JORGENSEN, J. B.: Survival of *M. paratuberculosis* in slurry. Nord. Vet.-Med., 29, 1977: 267-270.
- JORGENSEN, J. B.: An improved medium for culture of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine faeces. Acta Vet. Scand., 23, 1982: 325-335.
- JORGENSEN, J. B.: Diagnosis of clinical and non-clinical paratuberculosis by immunological and bacteriological methods. In: Proc. Int. Colloq. on Research in Paratuberculosis, AMES, Iowa, June 16-18, 1983: 136-141.
- JORGENSEN, J. B. - JENSEN, P. T.: Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to *Mycobacterium paratuberculosis* in cattle. Acta Vet. Scand., 19, 1978: 310-312.
- JULIAN, R. J.: A short review and some observations on Johne's disease with recommendations for control. Can. Vet. J., 16, 1975: 33-43.
- JUSTE, R. A. - SAEZ de OCARIZ, C. - MARCO, J. C.: Diagnosis of clinical paratuberculosis in sheep: A comparison of pathological, bacteriological and serological methods. In: 2nd Int. Colloq. on Paratuberculosis in Maisons-Alfort Cedex, Laboratoire central de recherches vétérinaires 1988: 220-226.
- JUSTE, R. A. - BADIOLA, J.J. - ARNAL, M. C. - BALAGUER, L. - GARCAMARIN, J. F. - SAEZ de OCARIZ, C. - MARCO, J. C.: A survey of ovine paratuberculosis in Aragon (Spain) by different methods. Paratuberculosis Newsletter, 3, 1991: 3-4.
- JUSTE, R. A. - SAEZ de OCARIZ, C. - BELTRANDEHEREDIA, F. - AGUD, J. - PORTU, J. - ALDAMIZETXEBARRIA, M.: Antibodies against *M. paratuberculosis* and professional activity. Paratuberculosis Newsletter, 3, 1992: 34.
- KALENSKÝ, P.: Diagnostika a výskyt paratuberkulózy hovädzieho dobytku v okrese Prešov v rokoch 1988-1992. [Atestační práce.] Prešov 1993. 79 s. - ŠVÚ Prešov.
- KARBE, A.: Vergleichende Untersuchung zur Diagnose der Paratuberkulose des Rindes mittels KBR, ELISA und AGIDT. [Inaugural-Dissertation.] Hannover 1988. 191 s. - Justus Liebig-Universität. Institut für tierärztliche Nahrungsmittelkunde.
- KLEE, W.: Paratuberculosis in cattle: diagnosis and control. Prakt. Tierarzt, 68, 1987: 55-57.
- KOBAYASHI, K. - BLASER, M. J. - BROWN, W. R.: Immunohistochemical examination for *Mycobacteria* in intestinal tissues from patients with Crohn's disease. Gastroenterology, 96, 1989: 1009-1016.
- KÖRMENDY, B.: Paratuberculosis in cattle herd-comparison of allergic, serologic and faecal microscopic tests. Acta Vet. Hung., 37, 1990: 219-223.

- KÖRMENDY, B. - TEMESVÁRI, E.: Examination of the diagnostic value of paratuberculin PPD (Johnin) in cattle populations in loose management system. *Allatorvosi Kőrlemlenyek*, 23, 1987: 99-103.
- KÖRMENDY, B. - JUHASZ, S. - LORINCZ, G.: Gas chromatographic characterization of the relationship between some *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium paratuberculosis* strains. *Acta Vet. Hung.*, 38, 1990: 195-203.
- KÖRMENDY, B. - KOPAL, T. - BALINT, T. - SZILAGYI, M. - BEKI, L.: Economic losses caused by paratuberculosis in a dairy herd: case report. *Acta Vet. Hung.*, 37, 1989: 45-53.
- KOSKOVÁ, S. - KUBÍČEK, O. - PAVLÍK, I.: Detection of *M. paratuberculosis* in faecal samples by DNA hybridisation. In: 13th Annual Conf. of the European Society for Mycobacteriology, Regensburg, 1992.
- KOSKOVÁ, S. - PAVLÍK, I. - KUBÍČEK, O.: Detection of *M. paratuberculosis* by DNA hybridisation. In: 12th Annual Conf. of the European Society for Mycobacteriology, Praha, 1991.
- KRUCKÝ, J.: Výskyt mykobakterií ve vyšetřovaných vzorcích v letech 1975-1979. *Veterinářství*, 31, 1981: 362-365.
- KUMAR, A.: Diagnosis of paratuberculosis in sheep. *Mod. Vet. Pract.*, 65, 1984: 139-141.
- KUMAR, A. - SHARMA, S. N. - SHARMA, K. N. - VYAS, S. B.: Studies on Russian merino sheeep: comparison of four diagnostic tests. *Indian Vet. J.*, 59, 1982: 352-357.
- LAMBRECHT, R. S. - COLLINS, M. T.: The effect of polyoxyethylene sorbitan monooleate on colony morphology and growth rate of *Mycobacterium paratuberculosis*. Abstract of Papers presented at the Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Disease, 66, 1985: 37.
- LARSEN, A. B. - KOPECKY, K. E.: Studies on the i.v. administration of Johnin to diagnose Johne's disease. *Amer. J. Vet. Res.*, 26, 1965: 673-675.
- LARSEN, A. B. - KOPECKY, K. E.: *Mycobacterium paratuberculosis* in reproductive organs and semen of bulls. *Amer. J. Vet. Res.*, 31, 1970: 255-258.
- LARSEN, A. B. - MERKAL, R. S.: The effect of management on the incidence of clinical Johne's disease. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.*, 152, 1968: 1771-1773.
- LARSEN, A. B. - PORTER, D. A. - VARDAMAN, T. H.: A modification of the Middlebrook-Dubos hemagglutination test for use in the diagnosis of Johne's disease. *Amer. J. Vet. Res.*, 14, 1953: 362-365.
- LARSEN, A. B. - VARDAMAN, T. H. - MERKAL, R. S.: An extend study of a herd of cattle naturally infected with Johne's disease. I. The significance of the intradermic test. *Amer. J. Vet. Res.*, 24, 1963a: 91-93.
- LARSEN, A. B. - VARDAMAN, T. H. - MERKAL, R. S.: An extend study of a herd of cattle naturally infected with Johne's disease. II. The significance of the complement fixation test. *Amer. J. Vet. Res.*, 24, 1963b: 948-950.
- LARSEN, A. B. - STALHEIM, O. H. B. - HUGHES, D. E. - APPELL, L. H. - RICHARDS, W. D. - HIMES, E. M.: *Mycobacterium paratuberculosis* in the semen and genital organs of a semendonor bull. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.*, 179, 1981: 169-171.
- LESLIE, P. - RIEMANN, H. - WEST, G. - MOE, A.: Vaccination field trial for *Mycobacterium paratuberculosis* (Johne's disease) in the caprine species. In: 2nd Int. Colloq. on Paratuberculosis in Maisons-Alfort Cedex, Laboratoire central de recherches vétérinaires 1988: 110-129.
- LEVY-FREBAULT, V. V. - THOREL, M. F. - VARNEROT, A. - GICQUEL, B.: DNA polymorphism in *Mycobacterium paratuberculosis*, wood pigeon mycobacteria and related mycobacteria analyzed by field inversion gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.*, 27, 1989: 2823-2826.

- LOPEZ, B. - RITACCO, V. - DeKANTOR, I. N. - DEBENEDETTI, R. - NADER, A. - BERNARDELLI, A.: Evaluation of an ELISA for the serodiagnosis of bovine paratuberculosis. *Paratuberculosis Newsletter*, 2, 1990: 5-6.
- LYLE, P. A. S. - MERKAL, R. S.: Comparison of ELISA and gel diffusion precipitin test for paratuberculosis in cattle, sheep, and goats. In: *Proc. Conf. Vet. Res. Inst., Parkville, Victoria, Australia, CSIRO* 1983: 109-112.
- MACINDOE, R. H. S.: What can we do about Johne's disease. *Austral. Vet. J.*, 26, 1950: 216-219.
- McCLURE, H. M. - CHIODINI, R. J. - ANDERSON, D. C. - SWENSON, R. B. - THAYER, W. R. - COUTU, J. A.: *Mycobacterium paratuberculosis* (Johne's disease) in a colony of stump-tail macaques (*Macaca arctoides*). *J. Infect. Diseases*, 155, 1987: 1011-1019.
- MCCULLOUGH, W. G. - MERKAL, R. S.: Structure of mycobactin J. *Curr. Microbiol.*, 7, 1982: 337-341.
- McDONALD, J. M. - COLLINS, M. T. - LAMBRECHT, R. S.: Radiometric detection of *Mycobacterium paratuberculosis* from clinical specimens. In: *Proc. Conf. Vet. Res. Inst., Parkville, Victoria, Australia, CSIRO* 1989: 146-152.
- McFADDEN, J. J. - HOUDAYER, C.: No evidence for antibodies to mycobacterial A60 antigen in Crohn's disease sera by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Med. Microbiol.*, 25, 1988: 295-299.
- McFADDEN, J. J. - BUTCHER, T. D. - CHIODINI, R. J. - HERMON-TAYLOR, H.: Determination of genome size and DNA homology between an unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease and other mycobacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 133, 1987: 211-214.
- McKENZIE, R. A. - WARD, W. H.: *Rhodococcus (Corynebacterium) equi*: a possible cause of reactions to the complement fixation test for Johne's disease of cattle (correspondence). *Austral. Vet. J.*, 57, 1981: 200-201.
- McNAB, W. B. - MEEK, A. H. - DUNCAN, J. B. - MARTIN, S. W. - VANDREUMEL, A. A.: An epidemiological study of paratuberculosis in dairy cattle in Ontario study design and prevalence estimates. *Can. J. Vet. Res.*, 55, 1991a: 246-251.
- McNAB, W. B. - MEEK, A. H. - DUNCAN, J. R. - BROOKS, B. W. - VANDREUME, A. A. - MARTIN, S. W. - NIELSEN, K. H. - SUGDEN, E. A. - TURCOTTE, C.: An evaluation of selected screening tests for bovine paratuberculosis. *Can. J. Vet. Res.*, 55, 1991b: 252-256.
- MERKAL, R. S.: Scanning electron microscopy of mycobacteria. *Am. Rev. Resp. Diseases*, 108, 1973a: 382-387.
- MERKAL, R. S.: Laboratory diagnosis of bovine paratuberculosis. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.*, 163, 1973b: 1100-1102.
- MERKAL, R. S.: Paratuberculosis advances in cultural, serologic and vaccination methods. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.*, 184, 1984: 939-943.
- MERKAL, R. S. - CURRAN, B. J.: Growth and metabolic characteristics of *M. paratuberculosis*. *Appl. Microbiol.*, 28, 1974: 276-279.
- MERKAL, R. S. - LITTLEDIKE, E. T. - COX, P. S.: A gel diffusion precipitin test for detection of paratuberculous cattle. In: *10th Joint US - Japan Tuber. Res. Conf.*, 1975: 473-482.
- MERKAL, R. S. - MCCULLOUGH, W. G.: A new mycobactin, mycobactin J, from *Mycobacterium paratuberculosis*. *Curr. Microbiol.*, 7, 1982: 333-335.
- MERKAL, R. S. - RICHARDS, W. D.: Inhibition of fungal growth in the cultural isolation of Mycobacteria. *Appl. Microbiol.*, 24, 1972: 205-207.

- MERKAL, R. S. - KOPECKY, K. E. - LARSEN, A. B. - THURSTON, J. R.: Improvement in the techniques for primary cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis*. Amer. J. Vet. Res., 25, 1964: 1290-1293.
- MERKAL, R. S. - LARSEN, A. B. - VELICER, L. F. - THURSTON, J. R.: Serologic and allergenic effects of 3 *Mycobacterium paratuberculosis* antigens. Amer. J. Vet. Res., 26, 1965: 1267-1270.
- MERKAL, R. S. - LARSEN, A. B. - KOPECKY, K. E. - NESS, R. D.: Comparison of examination and test method for early detection of paratuberculous cattle. Amer. J. Vet. Res., 29, 1968: 1533-1538.
- MERKAL, R. S. - KOPECKY, K. E. - LARSEN, A. B. - NESS, R. D.: Immunologic mechanisms in bovine paratuberculosis. Amer. J. Vet. Res., 31, 1970: 475-485.
- M'FADYEAN, J. - SHEATHER, A. L. - EDWARDS, J. T.: Johne's disease. J. Comp. Pathol. Therapy, 25, 1912: 217-275.
- MILNER, A. R. - MACK, W. N. - COATES, K. - WOOD, P. R. - SHELDRICK, P. - HILL, J. - GILL, I.: The absorbed ELISA for the diagnosis of Johne's disease in cattle. In: Proc. Conf. Vet. Res. Inst., Parkville, Victoria, Australia, CSIRO 1989: 158-163.
- MOLINA, A. - CRESPO, M. - MORERA, L. - LLANES, D.: Paratuberculosis in goats: serological diagnosis by ELISA test. Paratuberculosis Newsletter, 2, 1990: 11-14.
- MOMOTANI, E. - YOSHINO, T.: Caseous granulomas in bovine paratuberculosis. Jpn. J. Vet. Sci., 47, 1985: 487-491.
- MORRIS, J. A. - STEVENS, A. E.: An improved antigen for the paratuberculosis complement-fixation test. J. Bio. Stand., 5, 1977: 315-319.
- MOSS, M. - SANDERSON, J. - TIZARD, M. - HERMON-TAYLOR, J. - EL-ZAATARI, F. - MARKESICH, D. - GRAHAM, D.: Identification by PCR of *M. paratuberculosis* in long term cultures from Crohn's disease tissue. Paratuberculosis Newsletter, 3, 1991: 22-23.
- MUHAMMED, S. I.: Johne's disease. Vet. Rec., 102, 1978: 401-405.
- MUHAMMED, S. I. - ELIASSON, E. C.: The prevalence of antibodies to *Mycobacterium johnei* in colostrum derived lambs. Vet. Rec., 105, 1979: 11-12.
- MUHAMMED, S. I. - IVOGHILI, B.: Antibodies to *Mycobacterium paratuberculosis* in intestinal fluids of sheep with Johne's disease (paratuberculosis). Zbl. Vet.-Med., R. B, 27, 1980: 360-364.
- MUHAMMED, S. I. - IVOGHILI, B.: Diagnosis of Johne's disease in sheep by counterimmunoelectrophoresis. Trop. Anim. Hlth. Prod., 15, 1983: 53-57.
- NGUYEN, H. T. - BUERGELT, C. D.: Indirect immunoperoxidase test for the diagnosis of paratuberculosis. Amer. J. Vet. Res., 44, 1983: 2173-2174.
- NORRIS, M. J. - SPENCER, T. L.: The efficacy of the complement fixation test for the detection of *Mycobacterium paratuberculosis* infection in cattle. In: Proc. Conf. Vet. Res. Inst., Parkville, Victoria, Australia, CSIRO 1989: 153-157.
- OWEN, W. J.: An analysis of case reports of *Mycobacterium paratuberculosis* (Johne's disease) of cattle, sheep and goats at the Iowa state. In: Proc. Int. Colloq. on Research in Paratuberculosis, AMES, Iowa, June 16-18, 1983: 22-29.
- PALIWAL, O. P. - KRISHNA, L. - KULSHRESTHA, S. B.: Diagnosis of Johne's disease in sheep: I. - faecal examination and intradermal test. Indian J. Comp. Microbiol. Immunol. Infect. Diseases, 5, 1984: 73-75.
- PALIWAL, O. P. - REHBINDER, C.: Ultrastructural studies of paratuberculosis (Johne's disease) in goats. Acta Vet. Scand., 22, 1981: 180-188.

- PALIWAL, O. P. - MUKHERJEE, S. C. - SHARMA, A. K. - PARIHAR, N. S.: Evolution of rectal pinch, faecal examination and fluorescent antibody test for diagnosis of bovine paratuberculosis. *Indian J. Vet. Med.*, 5, 1985: 113-114.
- PATTERSON, D. S. P. - ALLEN, W. M.: Chronic mycobacterial enteritis in ruminant as a model of Crohn's disease. *Proc. R. Soc. Med.*, 65, 1972: 998-1001.
- PATTERSON, D. S. P. - ALLEN, W. M. - LLOYD, M. K.: Clinical Johne's disease as protein losing enteropathy. *Vet. Rec.*, 81, 1967: 717-718.
- PATTERSON, D. S. P. - BERRETT, S. - SWEAGEY, D.: Plasma enzyme and glycoprotein changes in experimental *Mycobacterium johnei* infection of calves. *J. Comp. Path.*, 79, 1969: 79-85.
- PAVLAS, M.: Biologické vlastnosti kmenů mykobakterií izolovaných u skotu z chovů s klinickou paratuberkulózou. *Vet. Med. (Praha)*, 35, 1990a: 523-528.
- PAVLAS, M.: Alergická a serologická diagnostika paratuberkulózy skotu. *Vet. Med. (Praha)*, 35, 1990b: 577-585.
- PAVLAS, M. - HANZLÍKOVÁ, M. - ŠTIKA, V.: Isolation of *M. paratuberculosis* from animals in Czechoslovakia: a 1-year study. In: 12th Annual Conf. of the European Society for Mycobacteriology, Praha, 1991a.
- PAVLAS, M. - HÁJKOVÁ, M. - ZBOŘIL, J.: Výzkum laboratorní diagnostiky paratuberkulózy skotu. [Výzkumná zpráva.] Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1984. 37 s.
- PAVLAS, M. - PAVLÍK, I. - ZBOŘIL, J.: Uplatnění komplexní diagnostiky při detekci a tlumení paratuberkulózy přežvýkavců. [Výzkumná zpráva.] Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1989. 47 s.
- PAVLAS, M. - PAVLÍK, I. - KOCIÁNOVÁ, I. - VESELÝ, T. - KOSKOVÁ, S. - KUBÍČEK, O. - RYCHLÍK, I. - HANZLÍKOVÁ, M. - ŠTIKA, V. - BUŘILOVÁ, E. - ZIMA, J. - KOLÁŘ, V. - VALENT, L. - MIŠKOVIČ, P. - KALENSKÝ, P.: Současný výskyt a stav diagnostiky paratuberkulózy skotu a ovcí. [Výzkumná zpráva.] Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1991b. 40 s.
- PAVLÍK, I.: Intravitální diagnostika paratuberkulózy skotu, ovcí a ostatních přežvýkavců. [Kandidátská dizertace.] Brno, 1992. 149 s. - Výzkumný ústav veterinárního lékařství.
- PAVLÍK, I. - PAVLAS, M. - ROZSYPALOVÁ, Z.: Kultivační průkaz *Mycobacterium paratuberculosis*. In: Sbor. Konf. o mikrobiologii tuberkulózy a nespecifických respiračních infekcích, Vyšné Hágy, 1992: 3.
- PAVLÍK, I. - PAVLAS, M. - VESELÝ, T. - BUŘILOVÁ, E.: Diagnosis of Johne's disease in cattle by indirect haemagglutination (IH), agar-gel immunodiffusion (AGID), complement fixation (CF) tests and enzyme-linked immunoassay (ELISA). In: 12th Annual Conf. of the European Society for Mycobacteriology, Praha, 1991.
- PAVLÍK, I. - BEJČKOVÁ, L. - PAVLAS, M. - ROZSYPALOVÁ, Z. - KOSKOVÁ, S.: Characterization by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization using IS900 of bovine, ovine, caprine and human dependent strains of *Mycobacterium paratuberculosis* isolated in various localities. *Vet. Microbiol.*, 1994a, v tisku.
- PAVLÍK, I. - BEJČKOVÁ, L. - FIXA, B.: DNA fingerprinting as a tool for epidemiological studies of paratuberculosis in ruminants and Crohn's disease. In: 4th Int. Colloq. Paratuberculosis, July 17-21, 1994, Cambridge, U. K.
- PEARSON, N. L.: A note on the occurrence in America of chronic bacterial dysentery of cattle. *Amer. Vet. Rev.*, 32, 1908: 602-605.
- PEMBERTON, D. H.: Diagnosis of Johne's disease in cattle using mesenteric lymph node biopsy: accuracy in clinical suspects. *Austral. Vet. J.*, 55, 1979: 216-217.

- PEPIN, M. - MARLY, J. - PARDON, P.: *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep and the complement fixation test for paratuberculosis. *Vet. Rec.*, 120, 1987: 236.
- POHL, C.: Epidemiologische Erhebung in Rinderbestände mit Paratuberkulose in Nordheim-Westfalen. [Inaugural-Dissertation.] Hannover 1993. 164 s. - Tierärztliche Hochschule Hannover. Institut für tierärztliche Nahrungsmittelkunde.
- RANKIN, J. D.: IV. Experimental infection. *Vet. Rec.*, 71, 1959: 1157-1167.
- RANKIN, J. D.: The experimental infection of cattle with *Mycobacterium johnei*. IV. Adult cattle maintained in an infections environment. *J. Comp. Path.*, 72, 1962: 113-117.
- RANKIN, J. D.: Die Paratuberkulose. In: MEISSNER, G. - SCHMIEDEL, A.: Mykobakterien und mykobakterielle Krankheiten. Band 4. Bovine Tuberkulose, aviare Tuberkulose und andere Mykobakteriosen. 1. vyd. Jena, VEB Gustav Fischer Verlag 1970: 323-354.
- REDDY, K. P. - SRIRAMAN, P. K. - RAO, P. R.: Haematological and biochemical changes in sheep in Johne's disease. *Indian Vet. J.*, 59, 1982: 498-502.
- RIDGE, S. E. - MORGAN, I. R. - CONDRON, R. J.: Comparison of the Johne's absorbed EIA and the complement-fixation test for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Paratuberculosis Newsletter*, 3, 1991: 15.
- RIEMAN, H. P. - ABBAS, B.: Diagnosis and control of bovine paratuberculosis. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, 27, 1983: 481-506.
- RICHARDS, W. D.: Effects of physical and chemical factors on the viability of *M. paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.*, 14, 1981: 587-588.
- RICHARDS, W. D.: A new, inexpensive test for detecting paratuberculosis in dairy herds. *Paratuberculosis Newsletter*, 2, 1990: 7-8.
- RINGS, D. M. - GARRY, F. B.: Amyloidosis associated with paratuberculosis in sheep. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.*, 10, 1988: 381-382.
- RIS, D. R. - HAMEL, K. L. - AYLING, J. M.: The detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces by isolation and the comparison of isolation with the examination of stained smears by light microscopy. *N. Z. Vet. J.*, 36, 1988: 112-115.
- ROHDE, R. F. - SHULAW, W. P.: Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the uterine flush fluids of cows with clinical paratuberculosis. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.*, 197, 1990: 1482-1484.
- ROHDE, R. F. - SHULAW, W. P. - HUESTON, W. D. - BECH-NIELSEN, S. - HAIBEL, G. K. - HOFFSIS, G. F.: Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from washed bovine ova. *Amer. J. Vet. Res.*, 51, 1990: 708-711.
- ROSENBERGER, A. E. - WHITLOCK, R. H. - SIEBERT, M. - SWEENEY, R. W. - HUTCHINSON, L. J.: Isolation of *M. paratuberculosis* from the environment of dairy farms with a known history of Johne's disease. *Paratuberculosis Newsletter*, 3, 1991: 30.
- SANDERSON, J. D. - MOSS, M. T. - TIZARD, M. L. V. - HERMON-TAYLOR, J.: PCR detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's disease tissue DNA extracts. *Paratuberculosis Newsletter*, 3, 1991: 22.
- SANFTLEBEN, P.: Quest continues for fast, reliable test for bovine paratuberculosis. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.*, 197, 1990: 299-306.
- SAXEGAARD, F. - BAESS, I.: Relationship between *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium paratuberculosis* and „wood pigeon mycobacteria“. *APMIS*, 96, 1988: 37-42.
- SEITZ, S. E. - HEIDER, L. E. - HUESTON, W. D. - BECH-NIELSEN, S. - RINGS, D. M. - SPANGLER, L.: Bovine fetal infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.*, 194, 1989: 1423-1427.

- SHERMAN, D. M. - GEZON, H. M.: Comparison of agar gel immunodiffusion and fecal culture for identification of goats with paratuberculosis. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.*, 177, 1980: 1208-1211.
- SHERMAN, D. M. - MARKHAM, R. J. F. - BATES, F.: Diagnosis of clinical Johne's disease in cattle using the agar gel immunodiffusion (AGID) test. In: *Proc. Int. Colloq. Res. in Paratuberculosis*, AMES, IOWA, June 16-18, 1983: 162-175.
- SHERMAN, D. M. - MARKHAM, R. J. F. - BATES, F.: Agar gel immunodiffusion test for diagnosis of clinical paratuberculosis in cattle. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.*, 185, 1984: 179-182.
- SHERMAN, D. M. - GAY, J. M. - BOULEY, D. S. - NELSON, G. H.: Comparison of the complement fixation and agar gel immunodiffusion tests for diagnosis of subclinical bovine paratuberculosis. *Amer. J. Vet. Res.*, 51, 1990: 461-465.
- SCHAAF, J. - BEERWERTH, W. - GRODDE, S.: Über die Paratuberkulose des Rindes, ihre Verbreitung, Diagnose und Bekämpfung. *Rindertuberkulose*, 4, 1956: 144-154.
- SIEGEL, R. C. - DeMAAR, T. - SHERMAN, D. M.: Epidemiology of paratuberculosis in mexican dairy herds. *Paratuberculosis Newsletter*, 3, 1991: 11.
- SINGH, S. N. - MADDUX, R. L. - KADEL, W. L.: Comparative evaluation of conventional double incubation culture methods for the isolation of *M. paratuberculosis* from bovine fecal samples. *Paratuberculosis Newsletter*, 3, 1991: 18-19.
- SMITH, H. W.: Modification of Dubos media for the cultivation of *M. johnei*. *J. Path. Bact.*, 66, 1953: 375-381.
- SMYTHE, R. H.: The clinical aspects of Johne's disease. *Vet. Rec.*, 15, 1935: 85-86.
- SNOW, G. A.: Mycobacteria. A growth factor for *M. johnei* Pt. 8. II. Degradation and identification of fragments. *J. Chem. Soc.*, 1965: 2588-2596.
- SOMVANSHI, P. - KOUL, G. L. - BISWAS, J.: Assessment of intravenous Johnin test in diagnosis of paratuberculosis in goats. *Indian J. Anim. Sci.*, 57, 1987: 974-976.
- STACHELSCHIED, H. L.: Zum kulturellen Nachweis von *Mycobacterium paratuberculosis* in Rinderkotproben. Vergleich zweier Dekontaminierungs- und Kulturverfahren. [Inaugural-Dissertation.] Gießen 1989. 118 s.
- STEPHENS, L. R.: Australian standard diagnostic techniques for animal diseases. No. 21. Johne's disease (paratuberculosis). East Melbourne, Australia, CSIRO 1987. 22 s.
- STEPHENS, L. R. - AUKEMA, R.: Johne's disease in Victoria. In: *Proc. Conf. Vet. Res. Inst.*, Parkville, Victoria, Australia, CSIRO 1989: 9-13.
- STUART, P.: Vaccination against Johne's disease in cattle exposed to experimental infection. *Brit. Vet. J.*, 121, 1965: 289-318.
- SUGDEN, E. A. - MICHAELIDES, A. - BOSSE, J.: Serodiagnosis of *M. paratuberculosis* infection using lipoarabinomannan and antigen D in enzyme-linked immunosorbant assays: comparison with agar gel immunodiffusion in sheep and after preabsorption of sera with *M. phlei* in cattle. *Paratuberculosis Newsletter*, 3, 1991: 16.
- SUGDEN, E. A. - SAMAGH, E. A. - BUNDLE, D. R. - DUNCAN, J. R.: Serodiagnosis of ovine paratuberculosis using lipoarabinomannan antigen in an enzyme-linked immunoassay. *Abstr.*, Amsterdam, 1986: 478-481.
- SUGDEN, E. A. - BROOKS, B. W. - CORNER, A. H. - NIELSEN, K. - TURCOTTE, C. - SHAPIRO, J. - DUNCAN, J. R.: A study of indirect enzyme immunoassay for ovine paratuberculosis using A and D protein antigens and lipoarabinomannan polysaccharid antigen. In: *2nd Int. Colloq. on Paratuberculosis in Maisons-Alfort Cedex*, Laboratoire central de recherches vétérinaires 1988: 231-235.
- SUMMERS, B. A.: Laboratory diagnosis of Johne's disease: a potential source of error. *Vet. Rec.*, 108, 1981: 166-167.

- SWEENEY, R. W. - WHITLOCK, R. H. - HERR, S. A. - ROSENBERGER, E. A.: Gastrointestinal transit of *M. paratuberculosis* in cattle following oral inoculation. Paratuberculosis Newsletter, 3, 1991: 19.
- ŠTIKA, V. - PAVLAS, M. - TOMKO, M.: Paratuberkulóza (literární studie). 1. vyd. Pardubice, Ústav veterinární osvěty 1989. 27 s.
- TAYLOR, A. W.: Varieties of *Mycobacterium johnei* isolated from sheep. J. Path. Bact., 63, 1951: 333-335.
- TAYLOR, T. K. - WILKS, C. R. - MCQUEEN, D. S.: Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from milk of a cow with Johne's disease. Vet. Rec., 109, 1981: 532-533.
- THAYER, W. R. - COUTU, J. A. - CHIODINI, R. J. - VanKRUININGEN, H. J. - MERKAL, R. S.: Inflammatory bowel disease II. Mycobacterial antibodies in Crohn's disease. Digest. Dis., 29, 1984: 1080-1085.
- THOREL, M. F.: Relationship between *Mycobacterium avium*, *M. paratuberculosis* and mycobacteria associated with Crohn's disease. Ann. Tech. Vet., 20, 1989: 417-431.
- THOREL, M. F. - KRICHEVSKY, M. - LEVY-FREBAULT, V. V.: Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. Int. J. Systematic Bact., 40, 1990: 254-260.
- TONTIS, A.: Die Paratuberkulose der Wiederkäuer in der Schweiz. UFA Revue, 1989: 23-25.
- TSAI, S. J. - HUTCHINSON, L. J. - ZARKOWER, A.: Comparison of dot immunobinding assay, enzyme-linked immunosorbent assay and immunodiffusion for serodiagnosis of paratuberculosis. Can. J. Vet. Res., 53, 1989: 405-411.
- TWORT, F. W. - INGRAM, G. L. Y.: A method for isolating and cultivating the *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis* and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudotuberculosis enteritis of bovine. Proc. Roy. Soc., 84, 1912: 517-543.
- TWORT, F. W. - INGRAM, G. L. Y.: A monograph of Johne's disease. 1. ed. London, Balliere Tindall and Cox 1913. 179 s.
- VALENTE, C. - GIALLETI, L. - CAPUA, I.: Diagnosis of paratuberculosis. Bacteriology and serological tests in cattle with different clinical conditions. Paratuberculosis Newsletter, 3, 1991: 7-8.
- VALENTIN-WEIGAND, P. - MURRAY, C. - MOZIARTY, K. M.: *Mycobacterium paratuberculosis* infected sheep as analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay and Western blotting. FEMS, 78, 1991: 145-148.
- VanKRUININGEN, H. J. - CHIODINI, R. J. - THAYER, W. R. - COUTU, J. A. - MERKAL, R. S. - RUNNELS, P. L.: Experimental disease in infant goats induced by a mycobacterium isolated from a patients with Crohn's disease. Digest. Dis. Sci., 31, 1986: 1351-1360.
- VARY, P. H. - ANDERSEN, P. R. - GREEN, E. - HERMON-TAYLOR, J. - McFADDEN, J. J.: Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. J. Clin. Microbiol., 28, 1990: 933-937.
- VESELÝ, T. - PAVLÍK, I.: SDS-PAGE and immunoblotting of *M. paratuberculosis* and other mycobacterial species. In: 12th Annual Conf. of the European Society for Mycobacteriology, Praha, 1991.
- WEBER, A. - CHRISTOPF, H.: Nachweis von Antikörper gegen Paratuberkulose (John'sche Krankheit) bei Schalenwild. Z. Jagdwiss., 26, 1980: 194-197.
- WEIDLICH, N.: Beitrag zur Histologie paratuberkulösen Darmentzündung des Rindes. Mh. Tierheilkde, 6, 1954: 226-238.

- WENTINK, G. H. - RUTTEN, V. P. M. G. - JAARTSVELD, F. J. H. - ZEEUWEN, A. A. P. A. - VanKOOTEN, P. J. S.: Diagnosis of paratuberculosis (Johne's disease) at a preclinical stage. *Tijdschr. Diergeneesk.*, 109, 1984: 739-750.
- WHIPPLE, D. L. - KAPKE, P. A. - ANDERSEN, P. R.: Analysis of restriction endonuclease fragment patterns of DNA from *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.*, 19, 1989: 189-196.
- WHIPPLE, D. L. - KAPKE, P. A. - ANDERSEN, P. R.: Identification of restriction fragment length polymorphisms in DNA from *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.*, 28, 1990: 2561-2564.
- WHIPPLE, D. L. - KAPKE, P. A. - ANDERSEN, P. R.: Comparison of IDEXX DNA probe test and three cultivation methods for detection of *M. paratuberculosis* in bovine feces. *Paratuberculosis Newsletter*, 3, 1991: 20.
- WHIPPLE, D. L. - MERKAL, R. S.: Modification in the techniques for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis*. In: *Proc. Int. Colloq. on Research in Paratuberculosis*, AMES, Iowa, June 16-18, 1983: 82-92.
- WHIPPLE, D. L. - LEBVRE, R. B. - ANDREWS, R. E. - THIERMANN, A. B.: Isolation and analysis of restriction endonuclease digestive patterns of chromosomal DNA from *Mycobacterium paratuberculosis* and other *Mycobacterium* species. *J. Clin. Microbiol.*, 1987: 1511-1515.
- WHITEHEAD, J. T.: Comparison of *Mycobacterium paratuberculosis* with other *Mycobacterium* spp. (including an isolate from a patient with Crohn's disease) by polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting techniques. In: *2nd Int. Colloq. on Paratuberculosis in Maisons-Alfort Cedex, Laboratoire central de recherches vétérinaires* 1988: 254-264.
- WHITEHEAD, J. T.: Definition of *Mycobacterium paratuberculosis* using polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting techniques. In: *Proc. Conf. Vet. Res. Inst., Parkville, Victoria, Australia, CSIRO* 1989: 121-128.
- WILKS, C. R. - TAYLOR, T. K. - RUSSELL, E. G. - THOMAS, T. R.: Isolation of mycobacteria inducing crossreactions in the complement fixation test for Johne's disease. *Res. Vet. Sci.*, 30, 1981: 323-327.
- WILKS, C. R. - LEPPER, A. W. D. - McCAUGNAN, C. J. - KOTIW, M.: An evaluation of lymphocyte transformation, enzyme-linked immunoassay and complement-fixation tests for the detection of animals in a dairy herd with endemic Johne's disease. In: *Proc. Int. Colloq. on Research in Paratuberculosis*, AMES, Iowa, June 16-18, 1983: 179.
- WILLIAMS, E. S. - DEMARTINI, J. C. - SNYDER, S. P.: Lymphocyte blastogenesis, complement fixation, and fecal culture as diagnostic tests for paratuberculosis in North American wild ruminants and domestic sheep. *Amer. J. Vet. Res.*, 46, 1985: 2317-2321.
- WILLIAMS, E. S. - SNYDER, S. P.: Experimental infection of North American wild ruminants with *Mycobacterium paratuberculosis*: clinical signs and pathology. In: *Proc. Int. Colloq. on Research in Paratuberculosis*, AMES, Iowa, June 16-18, 1983: 77-78.
- WOOD, P. R.: Diagnosis of Johne's disease in cattle. *Paratuberculosis Newsletter*, 3, 1991: 15.
- WOOD, P. R. - MILNER, A. R. - KOPSIDAST, K. - MACK, W. N. - COATES, K.: Gamma interferon and ELISA titres in cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. In: *2nd Int. Colloq. on Paratuberculosis in Maisons-Alfort Cedex, Laboratoire central de recherches vétérinaires* 1988: 215-219.
- WOOD, P. R. - KOPSIDAS, K. - MILNER, A. R. - HILL, J. - GILL, I. - WEBB, R. - MACK, W. N. - COATES, K.: The development of an *in vitro* cellular assay for Johne's disease in cattle. In: *Proc. Conf. Vet. Res. Inst., Parkville, Victoria, Australia, CSIRO* 1989: 164-167.

- WOODRUFF, T. S. - SHULAW, W. P. - BECH-NIELSEN, S. - HOFFSIS, G. F. - SPANGLER, E. - HEIDER, L. E.: Serodiagnosis of bovine paratuberculosis by use of a dot enzyme-linked immunosorbent assay. *Amer. J. Vet. Res.*, 52, 1991: 217-221.
- WORSAAE, H.: Radioimmunoassay for antibodies against *Mycobacterium paratuberculosis* using ¹²⁵I labelled PPD. *Acta Vet. Scand.*, 19, 1978: 153-155.
- YOKOMIZO, Y. - MERKAL, R. S. - LYLE, P. A. S.: Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine immunoglobulin G1 antibody to a protoplasmic antigen of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Amer. J. Vet. Res.*, 44, 1983a: 2205-2207.
- YOKOMIZO, Y. - YUGI, H. - MERKAL, R. S.: A method for avoiding false-positive reaction in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. In: *Proc. Int. Colloq. on Research in Paratuberculosis*, AMES, Iowa, June 16-18, 1983b: 94-108.
- YOKOMIZO, Y. - YUGI, H. - MERKAL, R. S.: A method for avoiding false-positive reaction in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Jap. J. Vet. Res.*, 47, 1985: 111-119.
- YOKOMIZO, Y. - NISHIMORI, K. - KISHIMA, M. - YUGI, H.: Evolution of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. A proposal of replacing the complement fixation test with the ELISA as the official diagnostic test for paratuberculosis in Japan. In: *2nd Int. Colloq. on Paratuberculosis in Maisons-Alfort Cedex*, Laboratoire central de recherches vétérinaires 1988: 206-214.
- ZHANG, S. Y. - WAHG, L. - LIU, H. W.: Indirect haemagglutination test for bovine paratuberculosis. *Chin. J. Vet. Med.*, 13, 1987: 12-14

Došlo 31. 3. 1994.

Incidence, economic importance and diagnosis of paratuberculosis.

Paratuberculosis is the most serious chronic bacterial disease of ruminants. Regarding the increasing incidence of the disease in the Czech Republic in connection with changing situation in agriculture and, among other factors, with import of animals we are presenting a summary of the latest data. We assume that high economic losses and expected participation of *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's disease in men will evoke a broad interest in the disease among people from various branches of veterinary and human diagnosis.

Contact Address:

MVDr. Ivo P a v l í k, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství,
Hudcova 70, 621 32 Brno, Czech Republic
Tel. 05 41321241, fax 05 41211229

Z VĚDECKÉHO ŽIVOTA

KONGRES SLOVENSKEJ VEDY '93 - ZBORNÍK REFERÁTŮV

Na pôde Centra strategických štúdií Slovenskej republiky (CSŠ SR) sa konalo 17. februára 1994 pracovné stretnutie pri príležitosti odovzdania Zborníka referátov z Kongresu slovenskej vedy 1993. Na stretnutí sa realizovala bohatá a zaujímavá diskusia pod vedením doc. Ing. I. K o s í r a, CSc., riaditeľa CSŠ SR, o ďalšom pôsobení a spolupráci s vedeckými pracovníkmi združenými v Kongrese slovenskej vedy '93 (KSV '93) z vysokých škôl, SAV, rezortných výskumných ústavov a podnikateľskej sféry, zameranej na vedecko-technický pokrok a inovačný proces.

Úvodom oboznámil prítomných prof. Dr. K. I v a n i č k a, DrSc., výkonný podpredseda KSV '93, s pripraveným komuniké a prológom ku zborníku. Vedeckí, výskumní a organizační pracovníci KSV '93 v úsilí pomôcť rozvoju slovenskej spoločnosti a pričiniť sa o jej prosperitu spracovali analýzy zo všetkých kľúčových sfér našej reality. Výsledky zhrnuli v štúdiách a referátoch prednesených na sérii podujatí 11 sekcií v priebehu roka 1993. Za účasti širokej vedeckej a výskumnej komunity sa pripravili návrhy a odporúčania, ktoré spolu s vystúpeniami autorov tvoria obsah zborníka.

Zborník sa skladá z 11 zväzkov z jednotlivých sekcií a jedného zväzku anglických abstraktov. Má 763 strán a obsahuje 247 prác z pera 334 autorov. Hlavným redaktorom je prof. Dr. K. I v a n i č k a, DrSc. a funkciu výkonnej redaktorky vykonala Ing. T. L e t k o v á. Edičnú radu tvorili editori jednotlivých zväzkov:

1. Veda a výskum (K. Ivanička - J. Brilla - V. Adamec)
2. Planéta Zem, zdroje a samoregulačné procesy (F. Hanic - P. Eliáš - L. Miklós)
3. Pôdohospodárstvo (J. Brindza - L. Hetényi - I. Maraček - T. Miština)
4. Človek - biografický a demografický model, zdravie, fyzická kultúra (R. Dzúrik - F. Makai - I. Horský)
5. Duchovný vývoj osobnosti a spoločnosti (D. Kováč - J. Strinka)
6. Slovenský národ - história, kultúra a vzťahy k iným národom (D. Kováč)
7. Edukačný systém (D. Driensky - Z. Obdržálek - J. Pastier)
8. Revitalizácia priemyslu, infraštruktúra, doprava, telekomunikácie (J. Belák - I. Hrivnák)
9. Ekonomický systém, reštrukturalizácia, prognózy a dynamický model vývoja SR (I. Kosír - J. Ferianc - J. Husár - T. Letková - G. Brhlovič)
10. Územný rozvoj Slovenska na báze regionálnych vied (V. Volko - J. Silvan - I. Turzo)
11. Formovanie politického systému (M. Čič)
12. Abstracts of Papers

Každý zväzok obsahuje závery a odporúčania za skupinu vedných disciplín zahrnutých do príslušnej sekcie. Na formovaní záverov a odporúčaní sa podieľali i ostatní účastníci Kongresu. Spolu na zasadnutiach sekcií a plenárnom zhromaždení sa zúčastnilo vyše tisíc vedeckých a výskumných pracovníkov.

Pri otvorení rozpravy pracovného stretnutia prítomní boli zoznamení s organizačnou štruktúrou centra a snahou vytvoriť pri CSŠ SR poradný zbor z vedeckej a výskumnej komunity. Tvoriví pracovníci združení v KSV '93 boli navrhovaní za základ pri vytvorení poradného zboru. V diskusii sa iniciatíva CSŠ SR o zriadení poradného zboru stretla so všeobecnou podporou. Prítomnými bol rovnako prijatý aj návrh na pokračovanie Kongresu v činnosti, pre ktorú sa navrhli určité zamerania. Najväčšiu podporu dostal návrh PhDr. D. K o v á č a , DrSc., aby sa najbližší kongres zaoberal problematikou „Hodnota života“, a to komplexne z hľadiska jednotlivých ľudských aktivít. Za III. sekciu a komunitu veterinárnych lekárov doc. MVDr. I. M a r a č e k , DrSc. navrhol, aby CSŠ SR prispel ku koordinovaniu toku informácií o jednotnom výklade novej meniacej sa legislatívy na úseku hospodársko-právnych noriem a vzťahov v oblasti vedy, techniky a inovačnom procese. Bola by to účinná prevencia voči mnohým formálnym a administratívnym nedostatkom, ktoré zisťujú kontrolné orgány. Poukázal tiež na riziká pri nedocenení a prílišnom oklieštení veterinárskej vedy a techniky ako aj nadväznej komplexnej veterinárnej praxe v nastupujúcom veku biológie pri biologizácii a humanizácii poľnohospodárstva a potravinárstva na báze prudkého rozvoja biotechnológií, ako na to upozorňujú J. N a i s b i t t a P. A b u r d e n o v á v monografii: „Megatrendy 2000. Desať nových smerov na deväťdesiate roky“ (Bratislava, Bradlo 1992). Vyjadril tiež želanie, aby pri vytváraní poradného zboru expertov pri CSŠ SR sa nepozabudlo na zastúpenie z odboru veterinárneho lekárstva. Je viac ako na čase dňa veterinárskej medicíny prinavrátiť legislatívne, odborné a spoločenské postavenie z periférneho záujmu v poľnohospodársko-potravinárskom komplexe, keď to naša spoločnosť a jej reprezentácia s ochranou potravinového reťazca a následne so zdravím obyvateľstva vrátane predĺženia priemerného veku populácie myslí vážne.

Úplný Zborník referátov Kongresu slovenskej vedy '93 so všetkými 12 zväzkami je pre záujemcov k dispozícii v knižnici ZIS Ústavu experimentálnej veterinárnej medicíny, Hlinkova č.1/A, 040 01 Košice.

*Doc. MVDr. Imrich M a r a č e k , DrSc.
člen prípravného výboru KSV '93*

INFORMÁCIE Z ÚSTAVU EXPERIMENTÁLNEJ VETERINÁRNEJ MEDICÍNNY V KOŠICIACH

Dňa 17. 3. 1994 sa uskutočnilo zasadnutie Vedeckej rady Ústavu experimentálnej veterinárnej medicíny (ÚEVM) v Košiciach po prvej etape kvalitatívnej prestavby a vnútornej transformácie výskumného ústavu. V rámci programu zasadnutia prebehlo oponentské konanie syntetickej záverečnej správy riešeného projektu verejnoprospešného záujmu rezortu Ministerstva pôdohospodárstva SR v oblasti veterinárskeho lekárstva pod názvom: „Problémy zdravia zvierat, hygieny ich produktov a prostredia v podmienkach transformácie pôdohospodárstva“.

Rokovaniu vedeckej rady predsedal doc. MVDr. I. M a r a č e k , DrSc. a oponentské konanie viedol Ing. V. D z i u b a n z Ministerstva školstva a vedy SR. Na oponentskom konaní sa zúčastnili okrem členov Vedeckej rady ÚEVM oponenti, hostia a zodpovední riešitelia jednotlivých čiastkových úloh projektu.

Predložená syntetická záverečná správa, ktorej tézy predniesol doc. MVDr. I. M a r a č e k , DrSc., koordinátor projektu, bola oponovaná prof. MVDr. Dr. h. c. P. G a m č í k o m , DrSc. z ÚVL Košice, prof. MVDr. P. Š ť a s t n ý m , CSc. z VŠP Nitra, MVDr. J. K u b i n c o m , CSc. z ŠVS SR a MVDr. J. G a j d o š o m , CSc. z OVS a ŠVÚ Košice. V rámci oponentúry boli prednesené písomné stanoviská Ing. Š. F r i č t y k a , CSc., riaditeľa odboru vedy a vzdelávania MP SR, MVDr. Š. K a l a f u , CSc., hlavného veterinárneho lekára zo sekcie poľnohospodárskej výroby MP SR a prof. MVDr. I. M i k u l u , DrSc. z UVL Košice. Tak posudky, ako aj písomné stanoviská boli kritické, pritom kladné a odporúčali Vedeckej rade ÚEVM hodnotenú správu prijať a schváliť po zohľadnení pripomienok a oprave i doplnení vytknutých chýb a nedostatkov. Po zodpovedaní a zaujatí stanovísk koordinátora a zodpovedných riešiteľov čiastkových úloh na vznesené pripomienky a otázky z posudkov, stanovísk a všeobecnej diskusie boli Ing. V. D z i u b a n o m sformulované závery, ktoré Vedecká rada schválila.

Z úspešného vyriešenia jednotlivých čiastkových úloh v rámci riešeného projektu boli dosiahnuté výsledky, ktoré umožnili vypracovať nasledovné významnejšie závery pre praktické využitie v podmienkach transformujúceho sa pôdohospodárstva Slovenskej republiky:

- Optimalizovaný rýchly tkanivovo kultivačný test pre diagnostiku a titráciu vírusu besnoty *in vitro*
- Bunková inaktivovaná, koncentrovaná, purifikovaná antirabická vakcína pre domáce zvieratá
- Antisérum proti stafylokokovému enterotoxínu typu A
- Nutričný prípravok na stimuláciu produkcie a zdravia mláďat prežúvavcov

- Využitie monoklonálnych protilátok pre skvalitnenie a zrýchlenie detekcie *Streptococcus agalactiae*
- Automatizovaný systém vyhodnocovania kvality a kvantity krmív
- Využitie aktívneho vedenia pred- a popôrodného obdobia oviec v riadenej reprodukcii
- Súprava na detekciu pšeničných proteínov v tepelne opracovaných mäsových výrobkoch
- Metodika asanácie prostredia pri zdolávaní ohnisk nákaz hospodárskych zvierat
- Návrh štatútu pohotovostných veterinárnych asanačných skupín

Na základe prednesených téz záverečných správ z vyriešených rezortných grantov MVDr. P. N a d' o m , CSc., vedeckým sekretárom ústavu, Vedecká rada ÚEVM v Košiciach schválila dosiahnuté výsledky riešenia:

- Využitie gnotobiológie pri vývine metód na stimuláciu nástupu a rozvoja bachorového typu trávenia mláďat prežúvavcov
- Veterinárna kontrola a biotechnológia riadenej reprodukcie v interakcii k výžive prežúvavcov
- Vplyv výživy zvierat na obranyschopnosť voči chorobám a niektoré regulačné mechanizmy organizmu
- Kontaminácia kukurice aflatoxínom B₁ s návrhom dekontaminácie
- Výroba mobilných energetických zdrojov lignocelulóзовých materiálov
- Návrh na zlepšenie kontroly a monitorizácie cudzorodých látok v pôdohospodárstve

Výskumné správy z čiastkových úloh oponovaného projektu a zo schválených rezortných grantov sú pre odbornú verejnosť k dispozícii v knižnici ZIS Ústavu experimentálnej veterinárnej medicíny v Košiciach.

*Doc. MVDr. Imrich M a r a č e k , DrSc.,
predseda Vedeckej rady ÚEVM v Košiciach*

Upozornění pro autory vědeckých časopisů

Z důvodu rychlejšího a kvalitnějšího zpracování grafických příloh (grafů, schémat apod.) příspěvků zaslaných do redakce Vás žádáme o jejich dodání kromě tištěné formy i na disketách.

Týká se to samozřejmě těch grafických příloh, které byly vytvořeny v nějakém programu PC (např. CorelCHART, Quatro Pro, Lotus 1-2-3, MS Excel). Vzhledem k tomu, že nejsme schopni upravit a použít pro tisk všechny typy (formáty) grafických souborů, žádáme Vás, abyste nám také kromě originálních souborů (např. z MS Excel typ *.XLS) zasílali grafické předlohy vyexportované jako bodovou grafiku v jednom z těchto formátů:

Bitmap	*.BMP
Encapsulated Postscript	*.EPS
Graphic Interchange Format	*.GIF
Mac paint	*.MAC
MS Paint	*.MSP
Adobe Photoshop	*.PSD
Scitex	*.SCT
Targa	*.TGA
Tag Image File Format	*.TIF

Redakce časopisu



ADEKO a. s. Vám nabízí

- ☐ **FINANČNÍ LEASING**
- ☐ **ZPROSTŘEDKOVATELSKOU OBCHODNÍ ČINNOST**
- ☐ **PORADENSTVÍ V OBLASTI PODNIKÁNÍ, FINANCOVÁNÍ A ORGANIZACE**

ADEKO a. s.
Slezská 7
120 56 Praha 2

tel.: 258 342

fax: 207 229



OBSAH – CONTENTS

Stojiljković Z., Čapak D., Mirčetić R.: The role of the periosteum in the healing of the dog's Müller-plate treated femur fracture – Úloha periosteá v procesu hojení zlomeniny stehenní kosti u psů při použití Müllerovy dlahy	435
Mojžiš J., Ništiar F., Kováč G., Mojžišová G.: Preventívny účinok zeolitu pri intoxikácii potkanov látkou VX – Preventive effects of zeolite in sewer-rat intoxication with VX substance	443

PŘEHLEDY

Pavlík I., Pavlas M., Bejčková L.: Výskyt, ekonomický význam a diagnostika paratuberkulózy – Incidence, economic importance and diagnosis of paratuberculosis	451
---	-----

Z VĚDECKÉHO ŽIVOTA

Maraček I.: Kongres slovenskej vedy '93 - Zbomík referátov	497
--	-----

INFORMACE

Maraček I.: Informácie z Ústavu experimentálnej veterinárnej medicíny v Košiciach	499
---	-----

UPOZORNĚNÍ PRO ODBĚRATELE

Od letošního roku vyřizuje veškeré služby spojené s distribucí časopisu Veterinární medicína vydavatel - Ústav zemědělských a potravinářských informací Praha.

Objednávky na předplatné posílejte na adresu:

Ústav zemědělských a potravinářských informací
referát odbytu
Slezská 7
120 56 Praha 2

Vědecký časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA ● Vydává Česká akademie zemědělských věd a Slovenská akadémia pôdohospodárskych vied - Ústav zemědělských a potravinářských informací ● Vychází měsíčně ● Redaktorka: ing. Zdenka Radošová ● Redakce: Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/25 75 41 ● Sazba: Studio DOMINO - ing. Jaku Černý, Pražská 108, 266 01 Beroun, tel.: 0311/240 15 ● Tisk: ÚZPI Praha ● © Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha 1994

Rozšiřuje Ústav zemědělských a potravinářských informací, referát odbytu, Slezská 120 56 Praha