



## CERTIFIKOVANÁ METODIKA

---

### Ozdravování stád skotu od bovinní virové diarey – slizniční choroby (BVD-MD)

MVDr. Kamil Kovařčík, Ph.D.  
MVDr. Věra Fichtelová, Ph.D.

43  
2014

## **UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA č. 43**

Ozdravování stád skotu od bovinní virové diarey – slizniční choroby (BVD-MD)

### **Autorský kolektiv**

MVDr. Kamil Kovařík, Ph.D.

MVDr. Věra Fichtelová, Ph.D.

### **Oponenti**

MVDr. Jan Bažant

Ústřední veterinární správa

MVDr. Václav Osička

Společná zdravotní komise chovatelských svazů

Metodika byla vytvořena na základě výsledků řešení projektu Ministerstva zemědělství **NAZV QI101A094** a projektu **LO1218 MŠMT** v rámci programu NPU I.

ISBN 978-80-86895-42-0

**2014**

## I. Úvod

BVD (bovine viral diarrhoea, virový průjem skotu) je ekonomicky významným onemocněním v chovech skotu. Virus BVD způsobuje dvě onemocnění komplexně označované bovinní virová diarrhoea-slizniční choroba. Infekce vyvolané virem BVD jsou příčinou značných ekonomických ztrát v chovech skotu na celém světě. Podílí se na ekonomických ztrátách v produkci hovězího masa, nižší užitkovostí dojníc, nižší tržností mléka, nižším počtem odchovávaných telat a zvýšenými náklady na léčbu jiných onemocnění, které se u zvířat projeví v důsledku virem BVD vyvolané imunodeprese.

Onemocnění postihuje zejména sliznice trávicího i respiračního traktu s doprovodnými příznaky průjmů a zánětů sliznic. Virus BVD je schopen prostupovat placentou infikovaných březích plemenic. V závislosti na stadiu gravidity poškozuje vyvíjející se plod a vyvolává poruchy reprodukce. V časně fázi gravidity je příčinou resorpce embryí, později vyvolává malformace a v pozdní fázi gravidity způsobuje zmetání.

Virus BVD je zástupcem rodu *Pestivirus* z čeledi *Flaviviridae*. BVD viry patří ke dvěma samostatným druhům BVDV-1 a BVDV-2.<sup>1</sup> Na základě genetické analýzy se pak BVDV-1 i BVDV-2 viry řadí k několika subgenotypům. Nejčastěji diagnostikovanými subgenotypy v ČR jsou BVDV-1b a BVDV-1d.<sup>2</sup>

Na základě interakce mezi virem a infikovanými epiteliálními buňkami byly popsány dva biotypy viru: cytopatogenní (cp BVDV) a necytopatogenní (ncp BVDV). Infekce cytopatogenními viry vede k destrukci buňky, projevující se na buněčných kulturách jako cytopatický efekt. Necytopatogenní viry se v buňce množí bez cytopatického efektu. V chovech skotu cirkulují oba biotypy viru, 10 % izolátů představuje cytopatogenní a 90 % izolátů necytopatogenní biotypy viru.

BVD–MD postihuje skot všech věkových kategorií. V chovech s aktivní infekcí probíhá onemocnění u nejmladších věkových kategorií, kdy až 90 % telat je infikováno do věku 3 až 4 měsíců. Infekce probíhají po celý rok, přičemž komplikovanější průběh onemocnění probíhá zejména na podzim a na jaře. Onemocnění může probíhat i u jiných přežvýkavců, např. u ovcí, velbloudů, jelenů, losů a bizonů. Virus BVD byl izolován také od prasat.

Klinické onemocnění je doprovázeno virémií s vylučováním viru všemi sekrety a exkreta. Nejvýznamnějším zdrojem infekce jsou **perzistentně infikovaná zvířata**, která vylučují virus BVD po celý život. Virus BVD se šíří hlavně přímým stykem a na krátké vzdálenosti (metry) aerosolem. Z důvodu vysoké citlivosti viru BVD ve vnějším prostředí je nepřímá cesta šíření málo významná. Rizikové však mohou být hromadné veterinární zákroky. Proto se musí používat jednorázové pomůcky a nástroje (jehly, rukavice, inseminační pipety aj.), které výrazně snižují riziko přenosu. Dalším zdrojem šíření viru BVD mohou být kontaminované vakcíny a jiné biologické preparáty, při jejichž výrobě jsou používány substráty bovinního původu (např. séra pro kultivaci buněčných kultur).

Důsledky infekce virem BVD na jedince jsou ovlivněny jeho stářím a biotypem infikujícího viru.

**Posnatální infekce:** Vstupní branou infekce a místem primárního pomnožení viru jsou sliznice dutiny ústní, nosní, genitálního traktu nebo spojivky. Klinicky se infekce manifestuje jako gastroenteritida a je provázená výraznou krátkodobou imunodepresí (leukopenie a neutropenie).<sup>3</sup> Vlastní onemocnění probíhá v chovech většinou subklinicky, nicméně postižená zvířata snáze podléhají infekcím jiných patogenů. Vysoce virulentní viry s výrazným lymfocytotropickým účinkem vyvolávají těžká klinická onemocnění připomínající slizniční chorobu. Postnatální infekce vyvolá standartní imunitní odpověď, provázenou tvorbou specifických neutralizačních protilátek (imunokompetentní zvířata).

**Fetální infekce:** BVD virus přestupuje placentu a infikuje vyvíjející se plod. Infekce *necytopatogenním* biotypem viru do 120. gravidity vede k toleranci množení viru, takto postižení jedinci zůstávají celoživotně infikováni (imunotolerantní, perzistentně infikovaná zvířata) a vylučují infekční virus do prostředí všemi svými exkremty a sekrecemi.<sup>4</sup> Po superinfekci cytopatogenním virem se u těchto zvířat rozvíjí typická slizniční choroba. Infekce plodu *cytopatogenním* virem končí odúmrtním zárodku, abortem nebo narozením telat s různými vývojovými defekty.

**Klíčovým bodem kontroly a ozdravování od BVD-MD jsou perzistentně infikovaná zvířata (PI zvířata, vironosiči viru BVD) a jejich vyřazení ze stáda. Jejich podíl ve stádě je 0,5 až 2%.**

Přibližně od roku 2003 se v chovech v ČR začala uplatňovat systematická kontrola BVD infekce. Účast v těchto kontrolních programech je dobrovolná a do současnosti probíhá pouze na úrovni chovu. Celková nakažová situace infekce BVD v chovech skotu v ČR není známá. Nicméně v roce 2013 byla autory publikována studie popisující nakažovou situaci BVD v 86 chovech s vysokou koncentrací zvířat zjišťovanou od dubna 2011 do prosince 2012. Z celkového počtu bylo 59 chovů neinfikovaných a 27 infikovaných virem BVD. Přičemž ve třiceti neinfikovaných chovech byla již v minulosti provedena systematická eliminace viru.

BVD infekce patří k hlavním infekčním příčinám ztrát při odchovu telat. Foto K. Kovařík



PI zvířata zpravidla často do 1 roku života na následky oportunních infekcí. Foto K. Kovařík



## II. Cíl metodiky

Cílem metodiky je objasnit chovatelům skotu postup při ozdravení stád od BVD metodou, která je ekonomicky nejvýhodnější. Metodika byla ověřena ve 26 stádech skotu s vysokou koncentrací zvířat. Dále je v metodice kladen důraz na kritické body při ozdravování stád od této nákazy.

## III. Vlastní popis metodiky

V první řadě je nutno identifikovat nakažový status chovů.

### 1. Identifikace chovů s aktivní infekcí

Chov s aktivní infekcí BVD-MD se identifikuje vyšetřením tří indikátorových skupin zvířat:

- sérologické vyšetření telat ve stáří nad 6-8 měsíců - indikátorová skupina 6-10 zvířat
- sérologické vyšetření jalovic ve stáří 14-16 měsíců: - indikátorová skupina 6-10 zvířat
- sérologické vyšetření prvotetek - indikátorová skupina 6-10 zvířat

U stád do 300 ks zvířat doporučujeme odebrání 6 ks zvířat z každé skupiny, u stád nad 300 ks zvířat odběry 10ks z každé skupiny.

V případě pozitivního výsledku sérologických vyšetření je chov definován jako **CHOV S AKTIVNÍ INFEKČÍ BVD**.

V případě negativního výsledku sérologických vyšetření je chov definován jako **CHOV BEZ AKTIVNÍ INFEKCE BVD**.

Pokud se provede u chovů bez aktivní infekce opakované vyšetření indikátorových zvířat za 5-7 měsíců opět s negativním výsledkem, a bazénový vzorek mléka je sérologicky negativní, je chov definován jako **CHOV BVD PROSTÝ**.

#### Vyšetření bazénového vzorku mléka:

Doplňkově můžeme provést vyšetření bazénového vzorku mléka na virus a protilátky proti viru BVD. Nicméně tato vyšetření nejsou spolehlivým nástrojem k definování nakažového statusu stáda s dvěma výjimkami:

- pozitivní výsledek **virologického** vyšetření (RT-PCR) definuje stádo s aktivní infekcí BVD (negativní výsledek neznámá stádo bez aktivní infekce!!)
- negativní výsledek **sérologického** vyšetření (ELISA) definuje stádo s velkou pravděpodobností BVD prosté (pozitivní výsledek neznámá stádo s aktivní infekcí!!)

Diagnostika aktivní infekce v chovu je prováděna na základě podezření při projevení klinických příznaků svědčících pro infekci virem BVD - MD nebo cíleně pro zjištění statutu

chovu. Cílem je odhalení přítomnosti zdroje infekce ve stádě, kterým jsou perzistentně infikovaná zvířata.

## 2. Zásady ozdravení a eliminace PI zvířat:

Infekce BVD patří mezi nákazy s velmi složitou, avšak logickou patogenezi a epidemiologií. Pochopení těchto složitostí vede k poměrně jednoduchým, časově a ekonomicky ne příliš náročným ozdravovacím postupům ve srovnání s jinými nákazami (např. IBR, leukóza apod.).

Řešení infekcí BVD je založeno na přijatých opatřeních ve 4 základních oblastech:

- biosekurita
- eliminace perzistentně infikovaných zvířat (PI)
- monitoring
- imunizace

### 2.1. Biosekurita

Jedná se o soubor opatření k zabránění šíření infekčních agens mezi stády. Základem pro rozhodování o úrovni řešení nákazy (tlumení x ozdravení) musí být analýza protinákazových opatření směřující k zabránění opětovného vniknutí infekce do stáda (reinfekce). Při tomto rozhodování je třeba si uvědomit, že ozdravení stáda od nákazy je řešení jen jedné části problému, druhou neméně náročnou stránkou je udržení statusu ozdraveného stáda po eliminaci patogena ze stáda.

V rámci rozhodování o ozdravování je třeba se zaměřit u BVD na následující oblasti v rámci biosecurity:

- uzavřený obrat stáda
- kontrolovaný nákup z prověřených zdrojů, vyšetřená zvířata – zabránění nákupu PI zvířat a tzv. „Trojských krav“
- nákazová situace v daném regionu (demografické faktory, koncentrace zvířat, organizace pastev atd.)
- biologické služby (inseminace, embryotransfer, veterinář atd.)
- nepřímé zdroje infekce (odvozeny od schopnosti viru přežívat v infekční formě mimo hostitele).

Hlavním protinákazovým opatřením je zabránění kontaktu se zvířaty s neznámou nákazovou situací, nákup zvířat vylučujících virus a březích sérologicky pozitivních zvířat (**„trojských krav“**). Při nákupu březích zvířat musíme počítat s možností, že se zvíře mohlo nakazit v rizikové fázi březosti (do 120 dne), které má za následek navození imunotolerance plodu. U těchto tzv. trojských krav (sérologicky pozitivních, virologicky negativních březích zvířat) je riziko narození PI zvířete - nutno po porodu vyšetřit!

Nepřímé cesty přenosu jsou zcela okrajovým problémem. Virus je totiž ve vnějším prostředí velmi labilní a velmi citlivý na jakékoliv detergenty a kvarterní amoniové soli (běžné dezinfekční prostředky).

### 2.2. Eliminace perzistentně infikovaných zvířat (PI zvíře, vironosič)

U eliminace PI zvířat z chovu je třeba si uvědomit některé body v patogenezí onemocnění:

- **PI zvíře** se nakazí jako plod v 1/3 březosti a jako vironosič se již narodí. Po narození vylučuje celoživotně velké množství viru, čímž udržuje vysoký infekční tlak ve stádě a je hlavním zdrojem infekce pro ostatní zvířata. Tento infekční tlak je možné snížit nebo zcela eliminovat pouze jediným opatřením, a to vyřazením (eliminací) PI zvířat ze stáda. Počet PI zvířat ve stádě je 0,5-2,0 %.
- od těchto PI zvířat se mohou nakazit další zvířata (která se narodila zdravá) následkem přímého, nebo velmi úzkém kontaktu. U těchto zvířat proběhne krátkodobá (přechodná) infekce (transient infected animals – TI zvířata). Infekce u TI zvířat se v důsledku imunosuprese projevují vyšší nemocností nakažených zvířat. Tato TI zvířata se po krátkodobé viróze uzdraví (nejsou dále zdrojem viru BVD).

PI zvíře (příčina) x TI zvíře (následek)

Na základě pochopení těchto dvou bodů v patogenezi můžeme definovat zákonitosti, které usnadňují proces vyhledávání a eliminace PI zvířat. Využití těchto zákonitostí v postupu vyhledávání PI zvířat vede ke snížení počtu odběrů vzorků a následných laboratorních vyšetření. Tento postup lze označit jako „administrativní“ metoda ozdravení.

Mezi tyto zákonitosti patří:

**1. PI kráva porodí vždy potomka, který je perzistentně infikován (100%).**

Proč: - kráva, která se narodí PI je celý život infikovaná (virémie) a tudíž musí vždy nakazit plod v rizikové 1/3 březosti

**2. Zdravá kráva může porodit PI potomka**

Proč: - kráva, která se narodila zdravá, může porodit PI zvíře jako důsledek TI infekce v 1/3 březosti (dojde k infekci plodu), po prodělané viróze se kráva uzdraví (stane se virologicky negativní) avšak u plodu je navozena imunotolerance k viru BVD – narodí se PI

Pokud se na to samé podíváme z pohledu potomků, jsou možné dvě varianty:

**A. Virologicky negativní tele se narodí vždy jen krávě, která v žádném případě nemůže být PI**

Proč: - pokud se tele nenakazilo v rizikové 1/3 březosti, tak jeho matka nemohla mít v rizikové fázi březosti virémii a tudíž nemůže být perzistentně infikovaná.

**B. Virologicky pozitivní tele se může narodit PI krávě (viz. bod 1) i zdravé krávě (viz. bod 2)**

Pravidla pro „administrativní“ postup vyhledávání jsou:

- **pokud není potomek PI jeho matka v žádném případě nemůže být PI** (tzn., pokud vyšetřím potomka a je virologicky negativní, jeho matku již nemusím odebrat ani vyšetřovat – administrativně ji vyškrtnu ze seznamu zvířat)
- **pokud je potomek PI, odebere se jeho matku, která může a nemusí být PI** (viz. varianta B).

### Postup vyhledávání PI zvířat:

- pro identifikaci PI zvířat se odeberou individuální vzorky krevních sér od zvířat 6-26 měsíců (všechny zvířata do porodu). Vyšetření se provede metodou RT-PCR směsně v 50 vzorcích krevních sér. V případě pozitivního výsledku směsného vzorku se provede došetření individuálních vzorků dle schématu laboratoře
- dále se provede odběr ušních štěpů jaloviček do stáří 6 měsíců - provede se virologické vyšetření Ag ELISA testem
- virologicky pozitivní zvířata budou s odstupem 14-21 dní od prvního odběru **vždy** opět odebrány a zaslány na vyšetření k potvrzení výsledku. Cílem opakovaného vyšetření je rozlišit TI od PI zvířat a potvrdit, že bez jakýchkoliv pochyb vyřazujeme perzistentně infikované zvíře. Zároveň budou dohledány jejich matky a taktéž zaslány na vyšetření.
- opakované vyšetření slouží také ke kontrole identity virologicky pozitivního zvířete z prvního odběru (vyloučení administrativní chyby!)
- virologicky pozitivní zvířata potvrzena jako perzistentně infikovaná musí být bezpodmínečně vyřazena z chovu (jatky!)
- **následně se využije skutečnost, že pokud jalovička nebo býček nebyl diagnostikován jako perzistentně infikovaný, jeho matka v žádném případě nemůže být perzistentně infikována, tudíž ji nemusíme vyšetřovat.** Proto se administrativně vyškrtají z dalších odběrů všechny krávy, jejichž potomci nebyli identifikováni jako vironosiči. **Tento postup od mladých zvířat ke starším tak minimalizuje počty vyšetření u krav!**
- v další fázi zůstanou krávy, které nebyly vyšetřeny pře své potomky. Tyto krávy můžeme došetřit následujícím způsobem:
  - o odběr do hemosek a došetření stejným postupem jako 6-26 m. jalovice
  - o odběr bazénového vzorku mléka (do 200 ks krav ve vzorku)
  - o v rámci kontroly užítkovosti
  - o v rámci každoročních zdravotních zkoušek
- po vyhledání a odstranění všech PI zvířat ze stáda se provádí odběry vzorků ušních štěpů, novorozených telat po dobu 10-12 měsíců
- v této fázi je nutné zabránit kontaktu mezi nově narozenými zvířaty (nevyšetřenými) se zvířaty v rizikové fázi březosti. Toto je klíčový bod pro přerušování cirkulace viru v chovu.

### Základní předpoklady úspěšné eliminace:

- bezchybná administrativa (jde o vyřazení několika zvířat)
- dodržování základních principů ozdravování
- komunikace s laboratoří – výběr vhodných vyšetřovacích metod



## 2.3. Monitoring

### 2.3.1. Monitoring bezprostředně po eliminaci PI zvířat:

- namátkově sérologické vyšetření telat ve věku šesti až osmi měsíců (po vymizení kolostrálních protilátek). Vyšetření se opakuje 1x za 2 měsíce po dobu půl roku
- za půl roku se ke skupině přidá skupina 14-16 m. jalovic
- za rok se přidá skupina prvotetek.

Pokud nejsou protilátky proti původci BVD prokázány, je možné chov považovat za chov bez aktivní infekce BVD (bez PI zvířat), pak nastává období postupného vymizení protilátek proti viru BVD i u starších zvířat

### 2.3.2. Monitoring v chovech ozdravených od BVD-MD

Po eliminaci PI zvířat se monitoring stává velmi významnou součástí biosecurity. Cílem monitoringu je odhalit reinfekci stáda v co nejkratším časovém intervalu, kdy je možné zabránit infekci velké části stáda, zejména zvířat v rizikové fázi březosti. Reinfekce BVD, která má nepříznivý dopad na stádo je vždy reinfekce březích zvířat, která má za následek narození PI zvířete. Proto první příznaky epidemiologicky závažné reinfekce je sérologická pozitivita mladých zvířat. Pokud je tato reinfekce zjištěna včas, je možné odstranit PI zvíře dřív, než se v průběhu odchovu dostane do skupiny zvířat v rizikové fázi březosti, což má velmi závažný dopad na stádo.

Reinfekce stáda začíná velmi nenápadně, kdy se několik zvířat stane krátkodobě infikována (TI zvíře) jako důsledek kontaktu s PI zvířetem z jiného stáda. Tato TI zvířata jsou velmi omezeným zdrojem infekce pro další zvířata – infekce se prostřednictvím TI zvířat v podstatě nešíří. Pokud mezi TI zvířaty není kráva v rizikové fázi březosti, nemá to pro stádo žádný významný dopad. Pokud však dojde k nakažení zvířete v rizikové fázi březosti, narodí se ve stádě velmi omezený počet PI zvířat, často jen jeden (první fáze reinfekce). Pokud tato PI zvířata z první fáze reinfekce projdou bez povšimnutí z důvodu absence monitoringu odchovem až do skupiny zvířat v rizikové fázi březosti (trvá to nejméně 1 rok), dojde k infekci velkého množství plodů a dojde k druhé fázi reinfekce, která má za následek narození velkého počtu PI zvířat (běžně i desítek kusů) se značným vlivem na ekonomiku chovu. Tato charakteristika reinfekce chovu je u BVD velmi ojedinělá - mladá zvířata nakazí zvířata starší. U většiny nálezů je průběh infekce opačný (starší zvířata infikují mladší).

Pokud se však dostane do stáda přímo vironosič, zpravidla nastává ihned druhá fáze reinfekce chovu. To je však nejzávažnější porušení protinákazových opatření.

#### Postup:

- sérologické vyšetření telat ve stáří 6-8 měsíců - indikátorová skupina 6-10 zvířat 2 x ročně
- sérologické vyšetření telat ve stáří 14-16 měsíců - indikátorová skupina 6-10 zvířat 1-2 x ročně
- sérologické vyšetření prvotetek - indikátorová skupina 6-10 zvířat 1-2 x ročně
- sérologické vyšetření zmetalek na přítomnost protilátek proti viru BVD-MD
- doplňkově vyšetření bazénového vzorku mléka na přítomnost protilátek (a viru) 1x ročně

## 2.4. Imunizace

Infekce BVD patří mezi nákazy s velmi složitou, avšak logickou patogenezí a epidemiologií. Pochopení těchto složitostí vedlo k poměrně jednoduchým a velmi úspěšným ozdravovacím programům ve skandinávských zemích. Tento tzv. skandinávský model (eliminace vironosičů bez vakcinace) se stal základem ozdravovacích programů ve všech zemích, ve kterých je dále přizpůsobován dle konkrétních podmínek chovu. Klíčovým bodem těchto programů **je vždy identifikace a odstranění perzistentně infikovaných zvířat (vironosičů) z chovu.**

Ozdravovací programy jsou založeny na odstranění těchto vironosičů z chovu a zabránění infekce nových plodů (z kterých se rodí další vironosiči). Ozdravovací programy probíhají většinou bez vakcinace, pouze v indikovaných případech je používána **imunizace**, avšak jen **jako doplňkové opatření**. Vakcinace není nikde schválena z ekonomických důvodů jako povinný úkon ozdravovacích programů na úrovni celých států (Rakousko, Švýcarsko, Skotsko), ale jako úkon dobrovolný. Smyslem vakcinace je ve zcela specifických případech posílit imunitu matky s cílem zabránit infekci plodu (intrauterinní infekci). Hlavním důvodem pro použití vakcín je nemožnost zabránit kontaktu novorozenců, nevyšetřených telat se zvířaty v rizikové fázi březosti např. z technologických důvodů.

Bohužel žádná vakcína není 100% účinná, tudíž musí být chápána jen jako doplňkové opatření k identifikaci a eliminaci vironosičů, příp. jako nástroj k posílení biosecurity. Pokud se bavíme o vakcinaci k zabránění intrauterinních infekcí, máme na mysli vždy vakcíny monovalentní (jen proti BVD), které jsou pro tento účel schváleny. Bohužel tyto vakcíny jsou poměrně drahé a jejich efektivita nebyla zatím žádnou studií objektivně vyhodnocena v terénních podmínkách.

Polyvalentní vakcíny (proti více patogenům) jsou pro tento účel naprosto neúčinné a spíše komplikující, tudíž nevhodné. Smysl mají zejména ve výkrmnách a stádech s otevřeným obratem stáda, bez ambice na dlouhodobé řešení infekce BVD.

### 2.4.1. Autoimunizace

Jde o kontrolovaný, přirozený proces imunizace prostřednictvím PI zvířete. Jde o jeden z neúčinnějších způsobů dlouhodobé imunizace zvířat (často celoživotní!), kde je však hlavním kritickým bodem oddělení imunizované skupiny zvířat od březích zvířat. Ve většině chovů je to rizikový způsob imunizace a není doporučován. To proč zmiňujeme tento způsob imunizace je ten, že si málokdo uvědomí, že v první fázi ozdravování chovů – eliminaci PI zvířat je naprostá většina chovaných zvířat v důsledku vysokého infekčního tlaku infikována, a tudíž perfektně a dlouhodobě imunizována! (Guidelines for the investigation and control of BVD, <https://www.bvdaustralia.com.au/>).

### 2.4.2. Modifikované živé vakcíny

Živé vakcíny obsahují živý (oslabený) virus. Dvě aplikace během období několika týdnů jsou dostatečné pro relativně dlouhodobou ochranu. Účinnost této vakcinace je v experimentálních podmínkách 58-92%. Tato vakcína má však velké nevýhody v tom, že živý vakcinační virus je schopen infikovat plod a navodit PI infekci. Z tohoto důvodu se při ozdravování nepoužívá (na jedné straně virus ze stáda eliminujeme, vakcínou ho do stáda vracíme).

### 2.4.3. Inaktivované vakcíny

Vakcíny s inaktivovaným virem jsou pro tyto účely nejbezpečnější. Problém je, že jejich imunizační účinnost je nižší (25-100% v experimentálních podmínkách), a imunita krátkodobější. To vyžaduje *pravidelné každoroční revakcinace*.

Velmi dobře je tato problematika popsána: <http://www.bvd-info.ch/veterinarians/prophylaxis/>

#### **Obecná doporučení – vakcinace:**

- řešení problému infekcí BVD bez eliminace PI zvířat je z dlouhodobého hlediska neefektivní
- vakcinace může být využito jen jako doplňkové opatření při eliminaci PI a při biosekurity, nesmí znemožňovat monitoring
- polyvalentní vakcíny nejsou indikovány pro fetální protekci – neovlivňují příčinu ale důsledky infekcí BVD

## **3. Vzorkování, manipulace se vzorkem a jeho příprava, diagnostika**

### **3.1. Odběr vzorků**

Při odběru vzorků je nutno vzít v úvahu, některá omezení vyplývající z patogeneze onemocnění a možností diagnostických metod. Tato omezení jsou spojená se stářím zvířat.

#### Zvířata s kolostrálními protilátkami (do 5-6 m. stáří):

Vironosič se narodí ve většině případů matce, která v důsledku infekce vytvoří velmi vysoký titr protilátek, které v kolostru předá teleti. V důsledku toho dochází u PI telete v prvních měsících života k omezení množství viru v krvi – dochází k falešně negativním výsledkům při vyšetřování z krve (s výjimkou RT-PCR).

Z tohoto důvodu je nutno vyšetřovat zvířata s kolostrálními protilátkami z tzv. **kožních štěpů**. Odběr se provádí jednorázovými pomůckami, kdy se vyštípne cca 0,5 cm ušního boltce. V případě použití různých druhů vrubovacích kleští je nutno omezit kontaminaci vzorků důkladným očištěním kleští. Nedoporučuje se používání dezinfekčních prostředků z důvodu velké citlivosti viru k běžným dezinfekčním prostředkům. Doporučujeme opláchnout v čisté vodě a důkladně utřít kleště. Desinfekci odběrového místa provést po odběru vzorku.

Jsou publikovány různé údaje o možnosti využití metod pro průkaz viru z krve již od 3. měsíce věku, které uváděli v minulosti i výrobci diagnostik. Na základě našich zkušeností nedoporučujeme použití těchto metod před 5 – 6 měsícem stáří. V našich podmínkách je poměrně dost chovů, kde jsou kolostrální protilátky ve vysokých titrech zjišťovány i v pozdějším věku než jsou 3 měsíce. Z tohoto důvodu považujeme za bezpečnou hranici vyšetřování z krve od 5-6 měsíce. Na základě zkušeností i z jiných zemí výrobci diagnostik již neuvádějí použitelnost metod podle věku (od 3. měsíce), ale podle přítomnosti kolostrálních protilátek v konkrétním chovu (což je zpravidla do 6. m.),

#### Zvířata nad 6 měsíců stáří:

U těchto zvířat není při diagnostice z krve žádné omezení. Z hlediska pracnosti a manipulace se vzorky je preferováno krevní sérum.

## 3.2. Diagnostické metody

### 3.2.1. Kožní biopsie – ušní štěpy

Používá se metoda založená na detekci sekrečního antigenu BVD označeného jako E<sup>ms</sup> antigen, případně jiné schválené metody. Vzorky je možné transportovat do laboratoře čerstvé i v mraženém stavu. Nepřípustné jsou vzorky macerované, s počáteční hnilobou – což jsou procesy, které ničí virus ve vzorcích!

### 3.2.2. Krevní séra

Při ozdravování se krevní séra vyšetřují směsně v počtu až 50 ks pomocí RT-PCR (polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí). V případě pozitivního výsledku je nutno pozitivní vzorek došetřit – identifikovat individuální pozitivní vzorek. Postupy mohou být dva – použít pouze metody virologické nebo s využitím sérologického testu.

#### Použití virologických testů:

- provede se vyšetření směsných vzorků po 10ks a opět vyšetří RT-PCR (tzn. 5 směsných vzorků po 10ks).
- pozitivní směs 10 vzorků se vyšetří individuálně virologickým ELISA testem

#### Použití sérologie:

- pozitivní směs 50 vzorků se vyšetří sérologicky
- negativní vzorky a vzorky s nízkým titrem protilátek se došetří virologickým ELISA testem
- tento postup je výrazně levnější, většinou se dražším virologickým vyšetřením došetřuje do 5 vzorků z pozitivní směsi sér

Použití sérologie však vyžaduje značnou zkušenost s diagnostikou a má některá omezení. Nesmí se používat „blokovací“ ELISA testy, ale pouze semikvantitativní nepřímé ELISA testy. Tyto testy jsou nejlevnější a jsou schopny rozlišit vzorky podle titru protilátek. Využívá se toho, že vironosič je sérologicky negativní, nebo má ve vyjímečných případech velmi nízkou hladinu protilátek. Sérologii rozlišíme zvířata s vysokým titrem protilátek a zvířata s nízkým titrem protilátek, příp. negativní, které se došetří virologickým ELISA testem.

Tento způsob je asi o 2 000 Kč na směsný vzorek levnější, než využití pouze virologických testů.

Tato metoda je však kontraindikovaná ve vakcinovaných chovech!!

## III. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“

Současné metody ozdravování jsou založeny na plošných vyšetření celých stád. Navrhli jsme a ověřili v terénních podmínkách metodiku, která využívá některé zákonitosti v patogenezi a epidemiologii onemocnění, které usnadňují proces vyhledávání a eliminace PI zvířat. Využití těchto zákonitostí v postupu vyhledávání PI zvířat vede ke snížení počtu odběrů vzorků a následných laboratorních vyšetření tzn. je pro chovatele ekonomicky přijatelnější.

Novost spočívá ve vyšetřování od nejmladších zvířat a administrativním vyloučení matek zdravých potomků z dalšího vyšetřování. Tzn. jedním odběrem a vyšetřením získáme výsledky od potomka a zároveň jeho matky. Metodika byla ověřována od roku 2010 ve 26 chovech s vysokou koncentrací zvířat.

## **IV. Popis uplatnění certifikované metodiky**

Metoda je určena pro ozdravování v chovech skotu. Metodika je především určena pro chovatele skotu a pro chovatelské svazy. Uvedená metodika však může být nabídnuta i dalším laboratořím, které se podílejí na detekci veterinárních patogenů. Primárními uživateli výsledků budou konkrétní chovatelé skotu, chovatelské svazy a ČMSCH prostřednictvím laboratoří provádějící kontrolu užitkovosti.

## **V. Ekonomické aspekty**

### **Náklady na zavedení metodiky do laboratoře**

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

### **Ekonomický přínos pro chovatele**

BVD infekce patří mezi nejvýznamnější ekonomické nákazy v chovech skotu. Předpokládáme, že metodika může významně utlumit výskyt infekce BVD a také významně přispět k celkovému snížení prevalence BVD v chovech skotu v České republice. Při výskytu BVD v chovu je pro chovatele jedním z největších problémů finanční ztráta, kterou způsobuje zejména ztráty při odchovu telat, reprodukční problémy, oportunní infekce atd.

Odhady ekonomických ztrát způsobených infekcemi BVDV kolísají v závislosti na úrovni imunity v dané populaci a na biologických vlastnostech BVDV kmenů, zejména stupni patogenity a antigenní variantě. V Dánsku, při předpokládaném ročním výskytu nových akutních BVDV infekcí 34 %, jsou celkové ztráty odhadovány do výše 20 miliónů dolarů na jeden milión porodů, pokud se prokazatelně na ztrátách podílí BVDV kmeny s nízkou virulencí. Při stejné četnosti výskytu infekcí, ale způsobených vysoce patogenními kmeny BVDV, jsou ztráty odhadovány na 57 miliónů dolarů na jeden milión porodů. Bez ohledu na metodiku stanovení těchto kvalifikovaných odhadů jsou infekce skotu virem BVDV považovány za příčinu nezanedbatelných ekonomických ztrát.

## VI. Seznam použité literatury

1. Ridpath, J. F., Bolin, S. R., Dubovi E. J. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology* 1994;205:66-74.
2. Robešová B., Kovařík K., Vilček S. Genotyping of bovine viral diarrhoea virus isolates from Czech Republic. *Veterinární medicína* 2009; 9: 393-398.
3. Baker, J. C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1995;11:425–445.
4. Moenning, V., Liess., B. Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1995;11:477-487.
5. Moennig, V., Houe, H., Lindberg, A. BVD control in Europe: current status and perspectives. *Anim Health Res Rev* 2005;6:63-74.

## VII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

1. Kosinova E., Psikal I., Robesova B. and Kovarcik K. Real-time PCR for quantitation of bovine viral diarrhoea virus RNA using SYBR Green I fluorimetry. *Vet. Med. Czech* 52 (6), 2007, 253-261.
2. Robesova, B., Kovarcik, K., Vilcek, S.. Genotyping of bovine viral diarrhoea virus isolates *Vet. Med.* 54: 2009, 393-398.
3. Kovařík K., Fichtelová V. 2009. Tlumení virové infekce BVD u skotu. *Veterinářství*; 59: 432-435.
4. Kovařík K., Fichtelová V. 2009. Virový průjem skotu – slizniční choroba, BVD-MD. *Veterinářství*; 59:312-317.
5. Kovařík 2010. Nové přístupy ke zdolávání virových infekcí respiračního traktu. *Náš chov* 3/2010, 66-68.
6. Fichtelová V., Kovařík K 2010. Praktické zkušenosti s tlumením infekce virem BVD-MD ve vybraných chovech skotu. *Veterinářství*, 60, č. 11, 624-626.
7. Fichtelová V, Kovařík K 2010. Využití vyšetření smíšeného bazénového vzorku mléka při tlumení BVDV infekce. *Veterinářství*, 60, č.11, s.627-630.
8. Fichtelová V. Kovarcik K. Use of reverse transcription polymerase chain reaction to detect persistently infected lactating cows during elimination of bovine viral diarrhoea virus from herds.-In *Proceedings of 6th European Congress of Bovine Health Management*, 7.-9. September 2011, Liege, Belgium, 92.
9. Fichtelová V, Kovařík K 2011. Slizniční choroba skotu. *Veterinářství* 2011; 61: 732-734.
10. Fichtelová V., Kovařík K. 2012 „Trojská kráva“ a reinfekce chovu virem BVD. *Veterinářství*, 2012, 62, 556-557.
11. Fichtelova V. Kovarcik K. Diagnostic tests to classify BVDV ( Bovine Viral Diarrhoea Virus) status in large cattle herds. In: *Proceedings of XXVII. world buiatrics congress*“, 3-8 June 2012, Lisbon, Portugal, 227-228.
12. Huvarová I., Fichtelová V, Kovařík K. BVDV subtypes recently circulating in cattle herds in the Czech Republic. In: *Proceedings of international congress of veterinary virology „One world, one health, one virology“*, 4-7 september 2012, Madrid, Spain, 172-173.

13. Fichtelová V, Kovařík K. Serum samples in detection of animals persistently infected with BVDV. In: Proceedings of international congress of veterinary virology „One world, one health, one virology“, 4-7 september 2012, Madrid, Spain, 232-233.
14. Kovařík K. 2013 Diagnostika virových patogenů se vztahem k respiračnímu ústrojí. Veterinářství 2013; 63: 144-147.
15. Fichtelová V., Kovařík K. 2013. BVD-MD bovinní virová diarea-slizniční choroba. Biosekurita a prevence infekčních chorob skotu. Náš chov 8/2013., příloha str. 12-13.
16. Fichtelová V., Kovařík K. 2013. Nákazová situace BVD infekce v chovech skotu. Veterinářství 8/2013, 593-597.

### **Dedikace:**

Uvedená metodika vznikla v rámci řešení projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum „METLUM“ (QI101A094) a projektu LO1218 MŠMT v rámci programu NPU I.

### **Oponentní posudky:**

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

Podíl autorů na tvorbě metodiky:

MVDr. Kamil Kovařík, Ph.D. (60 %), MVDr. Věra Fichtelová, Ph.D. (40%)

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

Státní veterinární správa ČR  
Praha 1  
Slezská 7

**v y d á v á**

# **OSVĚDČENÍ**

číslo: SVS/2014/105112-G

o uznání uplatněné certifikované metodiky  
v souladu s podmínkami „Metodiky hodnocení výsledků výzkumu a vývoje“

**Ozdravování stád skotu od bovinní virové diarey – slizniční choroby  
(BVD-MD).**

MVDr. Kamil Kovařík, Ph.D., MVDr. Věra Fichtelová, Ph.D.  
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i. v Brně

Vypracované v rámci výzkumného projektu/záměru č. QI101A094 (Metody  
tlumení produkčních chorob skotu - BVD-MD a paratuberkulóza) a projektu  
**LO1218 MŠMT** v rámci programu NPU I.


V Praze dne 19. 12. 2014

*(Razítko odborného orgánu státní správy):*

ÚSTŘEDNÍ VETERINÁRNÍ SPRÁVA  
STÁTNÍ VETERINÁRNÍ SPRÁVY  
Slezská 7/100, 120 56 Praha 2  
- 13 -

*(Jméno a funkce zástupce odborného útvaru státní správy):* Doc. MVDr. Milan Malena, Ph.D.  
ústřední ředitel

*(Podpis zástupce odborného útvaru státní správy):*

.....  




VU<sup>Ve</sup>L 

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

Tel.: +420 5 3333 1111; [www.vri.cz](http://www.vri.cz); e-mail: [vri@vri.cz](mailto:vri@vri.cz)