

AKTUELNI PRISTUP DIAGNOSTICI PARATUBERKULOZE U GOVEDA

Branka Vidić *, Živoslav Grgić, Sara Savić, Dubravka Milanov, Nadežda Prica

¹ Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“, Novi Sad, Rumenački put 20

Kratak sadržaj

Dijagnostika paratuberkuloze ima dva glavna cilja: monitoring zapata i pozdanu identifikaciju pozitivnih jedinki u zapatu. Postavljanje dijagnoze paratuberkuloze se vrši primenom direktnih metoda, odnosno dokazivanje uzročnika ili indirektno, merenjem imunološke reakcije. Meritornost dijagnostičkog metoda dominantno zavisi od stadijuma oboljenja kod inficirane jedinke. Direktna identifikacija *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* u uzorku fecesa je limitirana izlučivanjem malog broja bakterija, intermitentnim izlučivanjem i dr. Bakteriološko ispitivanje fecesa je vredan dijagnostički postupak za otkrivanje klinički oboljelih krava kao i za subkliničke infekcije. Direktna identifikacija MAP u fecesu ili uzocima organa metodom PCR značajno će skratiti vreme dokazivanja infekcije. Utvrđivanje prevalencije primenom indirektnih testova je takođe komplikovano i ograničeno. Dokazivanje antitela ELISA testom smatra se metodom izbora za dijagnostiku paratuberkuloze zbog brzine izvođenja i relativno niske cene koštanja. Uprkos kontinuiranim i brojnim istraživanjima problem otkrivanja subkliničkih infekcija je i dalje prisutan, posebno u stadima sa niskom prevalencijom pozitivnih životinja. Brojni napori istraživača se vrše kako bi se poboljšale postojeće i razvile nove dijagnostičke procedure za otkrivanje paratuberkuloze. Međutim, kontrola oboljenja je moguća čak i sada, kombinacijom redovne dijagnostike strogim sanitarnim režimom i identifikacijom inficiranih životinja.

Ključne reči: goveda, paratuberkuloza, dijagnostika, mere kontrole

* E-mail: branka@niv.ns.ac.rs

CURRENT APPROACHES TO DIAGNOSIS OF PARATUBERCULOSIS IN CATTLE

Branka Vidić¹, Živoslav Grgić, Sara Savić, Dubravka Milanov, Nadežda Prica

¹Scientific Veterinary Institute „Novi Sad“, Novi Sad, Rumenački put 20

Abstracts

Diagnostics of paratuberculosis aims at two goals: first, monitoring the herd, and second, reliable identification of positive animals. Bovine paratuberculosis is diagnosed by the application of direct methods, i.e. by identification of the agent, or indirectly by measuring immunology response. The relevance of a diagnostic method is determined by the stage of the disease in animal. Direct identification of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in a feces sample is limited by the fact of small number of secreted bacteria by intermitent secretion. Bacteriological examination of feces is a valuable diagnostic procedure for detection of animals with clinical symptoms and the animals with subclinical manifestation. Direct identification of MAP in feces and organ samples using PCR method considerably shortens the time for proving the evidence of a disease. The indirect methods for proving the prevalence are complicated and limited. ELISA assay is considered the method of choice for diagnosis of paratuberculosis due to its rapidity and relatively low costs. Despite continual and numerous research, the problem of detecting subclinical infection has not been solved yet especially in the herds with low prevalence of positive animals. Numerous efforts of researches have been done in order to improve the current methods and develop new diagnostic procedures for diagnosis of paratuberculosis. However, already now the control of the disease is possible due to the combination of regular diagnostic through sanitary measures and identification of the infected animals.

Key words: cattle, paratuberculosis, diagnostic, control measures

UVOD

Paratuberkuloza je neizlečivi, hronični granulomatozni enteritis uzrokovan *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. To je nepokretan gram pozitivan, acido rezistentan mikroorganizam. Osobina koja izdvaja MAP je njegova nesposobnost da raste na veštačkim podlogama u primarnoj kulturi bez dodatka faktora rasta, mycobactina. Paratuberkuloza je rasprostranjena u mnogim zemljama Evrope, SAD-a, Australiji, Kanadi, Japanu, Južnoj Americi i nekim afričkim zemljama (Cousins i sar., 1995; Kalis i sar., 2003; Vidić i sar., 2001a; Vidić i sar., 2001b). Na osnovu brojnih ispitivanja utvrđeno je da se broj zaraženih životinja značajno povećao. Serološkim

ispitivanjima utvrđeno je i do 30% inficiranih životinja. Teško je odrediti stepen prevalencije oboljenja na određenom području, jer je postavljanje dijagnoze veoma složeno i nije uvek pouzdano. Slučajevi oboljenja ne prijavljuju se uvek, osim ako se ne vrše određena ciljana istraživanje ili ako nije preduzet neki eradikacioni program. Uprkos kontinuiranim i brojnim istraživanjima, problem otkrivanja subkliničkih infekcija je i dalje prisutan. Ta činjenica, kao i složen postupak postavljanja laboratorijske dijagnoze, uslovilo je permanentno širenja infekcije u zapatima preživara, stoga preduzete mere u kontroli paratuberkuloze nisu bile dovoljno efikasne. Tačni i precizni podaci o prisustvu i rasprostranjenosti paratuberkuloze, koji su neophodan preduslov primene programa kontrole ove bolesti, limitirani su nedostatkom pode-
snog skrining testa za otkrivanje subkliničkih infekcija.

MAP se navodi kao mogući etiološki agens ili jedan od agenasa koji su u vezi sa Kronovom bolesti u ljudi. Smatra se da su mleko i mlečni proizvodi mogući izvori humanih infekcija. MAP je dokazan u svežem i pasterezovanom mleku.

NAČINI PRENOŠENJA I PATOGENEZA

Životinje se inficiraju preko hrane i vode kontaminirane fecesom zaraženih životinja. Bolest se širi prodajom latentno inficiranih životinja. Inficirane životinje, zbog dugog perioda inkubacije, mogu fecesom izlučivati uzročnika 15-18 meseci pre nego što se pojave klinički znaci bolesti. Zaraza se širi preko kontaminiranih pašnjaka. Telad su posebno osetljiva u prvim mesecima života, a glavni izvor infekcije je kontaminirano mleko. U uslovima spoljne sredine MAP, uzročnik je relativno osetljiv na sunčevu svetlost, isušivanje, visok sadržaj kalcijuma i bazna pH zemljišta. Na pašnjacima se održava i do jedne godine, a u osoci i do 287 dana. Od faktora koji utiču na pojavu kliničkih infekcija su infektivna doze, deficitarna ishrana, nagla promena u ishrani, starost, stres, partus, transport kao i imunosupresivni agensi (BVD-virus). U inficiranim zapatima klinički manifestna forma bolesti uočava se samo kod 3-5% životinja. Ostali ekonomski gubici mogu se ogledati u smanjenju reproduktivnih i proizvodnih sposobnosti.

MAP se razmnožava u sluzokoži tankih creva i izaziva bujanje specifičnog granulacionog tkiva. Limfogenim putem bakterije se prenose do submukoze i pripadajućih mezenterijalnih limfnih čvorova. Multiplikacija uzročnika u submukozu intestinumu širenjem infekcije na mezenterijalne limfne čvorove kao i u slezini, jetri, plućima, srcu, bubrezima, uterusu, mlečnoj žlezdi, fetusu, genitalnom traktu i semenu bikova, konstatovano je kod životinja sa manifestnom formom bolesti. U zaraženom području životinje su izložene reinfekciji, ali bez vidljivog kliničkog efekta. Vreme inicijalne infekcije igra važnu ulogu za dalji tok bolesti, dok je značaj reinfekcije sporadan. Intenzitet infekcije vezan je za starost životinje u vreme prvog kontakta sa uzročnikom, tako da su starije životinje otpornije na pojavu kliničkih znakova bolesti.

Kod goveda klinički znaci se ne javljaju pre druge godine starosti, a uglavnom se ispoljavaju u periodu od 2-6 godine. Najčešće se bolest uoči kod jedne životinje, retko kod nekoliko. Bolest se širi lagano. Gubitak težine je najočiglednija promena i uglavnom je praćena submandibularnim edemom koji pokazuje tendenciju nestanka sa pojavom proliva. Zapaža se pad mlečnosti pre pojave proliva kod krava. Životinja ima očuvan apetit, normalnu temperaturu, ali se pojačava žeđ. Feces je redak i oskudan, homogen, nema primesa krvi, epitelijalnog detritusa i neprijatnog mirisa. Proliv može biti kontinuiran ili intermitentan sa izraženom tendencijom poboljevanja u periodu kasnog graviditeta, da bi se posle partusa javio u izraženijoj formi. Privremeno poboljšanje se može postići premeštanjem životinja sa pašnjaka u objekte i davanje suve hrane. Tok bolesti varira, ali se uvek završava kao ozbiljna dehidracija, mršavljenje i potpuna iscrpljenost životinje.

LABORATORIJSKA DIJAGNOZA

Postavljanje dijagnoze paratuberkuloze ide u dva pravca: kod kliničke forme bolesti i otkrivanje subkliničkih infekcija. Dijagnostika paratuberkuloze ima dva glavna cilja, monitoring zapata i identifikacija pozitivnih jedinki. Postavljanje dijagnoze paratuberkuloze vrši direktnim dokazivanjem uzročnika primenom selektivnih podloga iz fecesa i tkiva ili dokazivanje genoma agensa PCR metodom. Indirektni metodi podrazumevaju utvrđivanje imune reakcije nalazom antitela u krvnom serumu ili mleku ili merenjem ćelijskog imuniteta. Nakon peroralne infekcije jedinke u prvim mesecima života, patogen penetrira mukozu tankih creva i odlazi u limfoidni sistem preko M ćelija. Makrofagi fagocituju bakterije i iniciraju ćelijski imunitet. MAP može da preživi i da se replikuje u makrofagama putem inhibicije baktericidne funkcije ovih ćelija. Jednom aktivirani makrofagi započinju aktivaciju T ćelija i klonalnu ekspanziju koja dovodi do produkcije karakterističnih citokina. Produkcija gama interferona IFN γ je jedna od reakcija koja se najranije detektuje kod MAP infekcije. Aktivnost ćelijskog imuniteta je neophodna za zadržavanje intracelularne infekcije. Međutim, izlučivanje bakterija, iako u malom broju, može se utvrditi kod mlađih kategorija goveda. Napredovanjem oboljenja humoralni odgovor se razvija. Humoralni odgovor nije zaštitni i ne zaustavlja progresiju MAP infekcije i patološkog delovanja. Kliničko slika oboljenje karakteriše se nespecifičnim simptomima poput hroničnog mršavljenja, smanjene produktivnosti i proliva. Životinja uginjavaju od malabsorpcije i deficita u ishrani.

DIREKTNO DOKAZIVANJE UZROČNIKA

Izolacija iz fecesa: iako zahteva dosta rada i vremena izolacija iz fecesa je i dalje najpouzdaniji metod za dijagnostiku paratuberkuloze. Osetljivost metoda zavisi

od stadijuma infekcije životinja, a specifičnost je 100%. Izolaciju uzročnika otežava kontaminacija uzoraka (druge bakterije, plesni, gljivice), izlučivanje malog broja bakterija, intermitentno izlučivanje, neophodnost primene odgovarajućih hranljivih podloga, a posebno usporen rast (3-5 meseci).

U rutinskoj dijagnostici, kultivacija na čvrstim podlogama je najčešća iako automatizovana tečna kultivacije postaje dostupna poslednjih godina (Bugarski i sar., 2005; Grgić i sar., 2008). Izolacija MAP iz fecesa ili uzoraka organa zahteva postupak dekontaminacije ispitujućih uzoraka kako bi se odstranile druge bakterije, gljivice i plesni koje su prisutne u velikom broju u fecesu. U sveta se koristi nekoliko metoda za dekontaminaciju (Robbe-Austerman i sar., 2006). Pokazalo se da su različite podloge korisne za primarnu izolaciju MAP slično izlaciji ostalih mikobakterija, tako da je kombinacija različitih vrsta podloga korisna. (Dargatz i sar., 2001). Za svoj rast MAP zahteva dodatak mycobactina u medijum, a ova osobina se koristi i za fenotipsku karakterizaciju MAP kolonija. Dodatkom faktora rasta u podlogu vreme do pojave vidljivih kolonija se skraćuje sa 12 na 3 nedelje, a dodatkom mikonazola u podlogu i centrifugovanje uzorka pre inokulacije na hranljivu podlogu povećava se stepen izolacije. Kako hranljiva podloga za rast MAP nije selektivna, identifikacija kolonija suspektnih na MAP je neophodna. Ovo se može postići determinacijom mycobactin zavisnog rasta i specifičnim PCR metodom.

Ovaj metod ocenjen je kao pouzdan pokazatelj infekcije kod živih životinja. Osnovna prednost ovog metoda je ta da se mogu identifikovati grla 1-3 godine pre nego što se jave klinički simptomi. Latentno inficirane životinje izlučuju mali broj bakterija, povremeno, pa uspeh izolacije zavisi od procedure dekontaminacije uzorka, vrste i kvaliteta podloge i broja epruveta za kultivaciju. Kultivacija u tečnom medijumu dala je nešto bolje rezultate, vreme kultivacije je skraćeno, ali je metod nešto složeniji.

PCR- lančana reakcija polimeraze

Različite ciljne sekvence genoma su identifikovane za molekularnu identifikaciju MAP (Bannantine i sar., 2002). Najčešći je to sekvenca IS900 koja se javlja u 14 do 20 kopija na MAP genomu (Bugarski i sar., 2005). Pažljiva selekcija prajmer sekvence je neophodna, zato što su slične sekvence nađene i kod drugih mikobakterija, zbog čega se samo određeni IS900 parovi prajmera preporučuju (Kalis i sar., 1999). Tokom poslednjih godina druge specifične sekvence su detektovane poput f57, lokus 255, ISMap02 i drugi (Bannantine i sar., 2002; Kalis i sar., 1999; Robbe-Austerman i sar., 2006). Direktna identifikacija MAP u fecesu ili uzorcima organa metodom PCR značajno će skratiti vreme dokazivanja infekcije. Osetljivost PCR je svakako limitirana efikasnošću ekstrakcije DNA. Nivo detekcije direktnog PCR zavisi od količine bakterija u uzorcima fecesa i kreće se od 80-100% pozitivnih rezultata u uzorcima sa velikom količinom bakterija, što ukazuje na visoku senzitivnost PCR, kao i niži nivo detekcije u uzorcima sa manjom količinom bakterija (Bugarski i sar., 2005).

INDIREKTNI METODI

Dokazivanje specifičnih antitela

Imunološki odgovor antitelima razvija se kako oboljenje napreduje. Humoralni odgovor nije zaštitni i ne zaustavlja progresiju MAP infekcije i patologije. Dokazivanje antitela ELISA testom smatra se metodom izbora za dijagnostiku paratuberkuloze zbog brzine izvođenja i relativno niske cene koštanja. Agar gel imunodifuzioni test (AGID) i test fiksacije komplementa kao tradicionalni metodi za dijagnostiku ovog oboljenja gube na značaju. RVK test ima ograničenu primenu zbog mogućnosti lažno negativnih i lažno pozitivnih rezultata, osetljivost je oko 90% a specifičnost oko 70% kod kliničkih slučajeva paratuberkuloze. Zbog nezadovoljavajuće osetljivosti RVK nije pogodan za dijagnostiku subkliničkih slučajeva paratuberkuloze.

Međutim, broj komercijalnih ELISA testova koji se koriste u rutinskoj dijagnostici je limitiran. Uglavnom je baziran na kompleksnom antigenu MAP pripremljenom od citoplazmatskih proteina, celog antigena ili komponenti ćelijskog zida. Lažno pozitivna reakcija koja se može javiti upotrebom kompleksnog antigena u ELISA testu može se značajno redukovati ako se ispitujući uzorci tretiraju sa ekstraktom *M. phlei* (Möbius i sar., 2008; Vidić i sar., 2001). Detekcija antitela se može uraditi u krvi ili uzorcima mleka i određeni ELISA testovi pokazali su dobru korelaciju rezultata ispitivanja krvi i mleka (Stabel i sar., 2005). Rezultati iz literature koji se odnose na specifičnost i posebno na osetljivost pojedinih ELISA testova se znatno razlikuju, a ta varijabilnost zavisi od upotrebljenog antigena, populacije životinja koja je testirana i zlatnog standarda koji je odabran za karakterizaciju inficiranih i neinficiranih životinja. Podaci koji se odnose na specifičnost, i još više na osetljivost testa kod ispitivanja pojedinačnih jedinki se znatno razlikuje i kreću se od 6,9% do 88,2% (Cousins i sar., 1995). Poznato je da je osetljivost seroloških metoda za otkrivanje paratuberkuloze niska u poređenju sa drugim infektivnim oboljenjima. Osetljivost ELISA testa direktno zavisi od stadijuma infekcije jedinke. Nivo detekcije antitela je mnogo veći kod kliničkih nego kod latentno inficiranih krava (Cousins i sar., 1995). Pored toga, porast broja seropozitivnih grla je u direktnoj vezi sa intenzitetom izlučivanja uzročnika. Treba naglasiti da je osetljivost kulturnog metoda u poređenju sa ELISA testom daleko veća posebno kod latentno inficiranih krava. Pored toga, na osetljivost ELISA testa, odnosno njegovu meritornost, utiču i varijacije između stada, faktori iz spoljne sredine kao i prisustvo unakrsnih reakcija, kada se radi o infekcijama sa korinebakterijama, nokardijama i drugim mikobakterijama (Vidić i sar., 2001).

Test fluorescentnih antitela se može koristiti u dijagnostici, ali se ovim testom ne mogu razlikovati MAP od ostalih mikobakterija. Razvijen je i dot-imunoblotting assay (DIA). Poredeći efikasnost DIA i ELISA testa prednost DIA je u jednostavnosti, brzini, niskoj ceni i mogućnosti za širu primenu (de Juan L i sar., 2006). U nekim zemljama ELISA test se koristi u programima kontrole paratuberkuloze umesto kul-

turelnog pregleda, s obzirom na brzinu dobijanja rezultata i zadovoljavajuću specifičnost i osetljivost.

Dokazivanje ćelijskog imunog odgovora (imuniteta)

Kožni test za utvrđivanje reakcije kasne preosetljivosti na Johnin, prečišćeni proteinski derivat MAP, koristio se kao dijagnostički metod za paratuberkulozu u prošlosti. Danas se ovaj metod retko primenjuje zbog nedovoljne specifičnosti i osetljivosti. Test se sastajao u intradermalnoj aplikaciji 0,2 ml Johnin-a ili avijarnog tuberkulina kada se javlja kao reakcija na mestu aplikacije nakon 48 h u vidu zadebljanja kože, većem od 3mm, i označava kao pozitivan. Dokazivanje ćelijskog imuniteta smatra se jednim načinom za dijagnostiku paratuberkuloze kod mladih životinja. Danas postoje pokušaji da se gama interferon test koji se koristi u dijagnostici tuberkuloze kod goveda, prilagodi za dijagnozu paratuberkuloze (Harris i sar., 2005). Ovaj test je baziran na sposobnosti senzibilisanih T limfocita da oslobađaju gama IFN posle ponovne sa specifičnim antigenom. Za dijagnozu paratuberkuloze puna krv se inkubira 24 sata na 37°C u prisustvu johnina, bovinog ili avijarnog PPD i pufera. U supernatantu se nalazi oslobođeni gama interferon i dokazuje ELISA testom. Životinje se ocenjuju pozitivne na paratuberkulozu kada je nivo produkcije interferona kod Johnin-stimuliranih uzoraka prelazi nivo kod drugih uzoraka. Specifičnost testa nije zadovoljavajuća zbog toga što zavisi od raznih faktora, a rezultati osetljivosti nisu postojani. Meritornost testa zavise od temperature na kojoj se uzorci krvi transportuju čuvaju i obrađuju (Huda i sar., 2003; Nielsen i sar., 2004).

Za otkrivanje inficiranih životinja u literaturi opisane su i drugi metodi: test transformacija limfocita, inhibicija leukocitarne migracije i dr. (Kalis i sar., 2003; Vidić i sar., 2001).

NAŠA ISPITIVANJA

Saznanja o značaju paratuberkuloze, kao i činjenica da su neke susedne zemlje uvele obavezno ispitivanje goveda kod formiranja novih zapata krava, rezultirale su odlikom Uprave za veterinu da u okviru zdravstvenih standarda i kontrole zaraznih bolesti finansira istraživanja po posebnim projektima izučavanje paratuberkuloze kod goveda i ovaca, za dalje pravce delovanja na istraživačkom i zakonodavnom planu. Primenom ELISA testa ustanovili smo 29 pozitivnih nalaza, odnosno, 2,9% pozitivnih goveda, od ukupno ispitanih 1000 uzoraka seruma goveda na južnobačkom i sremskom epizootiološkom području (Grgić i sar., 1996). Na osnovu dobijenih rezultata može se oceniti da je nivo seroprevalence nizak u odnosu na podatke iz drugih zemalja, ali to svakako ne govori o stepenu inficiranosti sa MAP. Nizak stepen inficiranosti, pre svega u krava, bilo bi korisno zadržati, primenom određenih mera. Ovo se odnosi na mini farme ili veće farme muznih krava.

Prva serološka ispitivanja prisustva paratuberkuloze u goveda vršena su pre 15 godina na području AP Vojvodine (van Weering i sar., 2007; Vidić i sar., 2002). Ispitivanjem je obuhvaćeno 845 krvnih seruma krava sa 12 farmi. Uzorci krvnih seruma odabrani su metodom slobodnog izbora, izdvajanjem 10% uzoraka krvnih seruma koji su dostavljani u laboratoriju u okviru redovnih godišnjih ispitivanja na brucelezu i leptospirozu. Za dokazivanje specifičnih antitela za MAP primenjena su dva metoda: agar-gel imunodifuzioni (AGID) test i reakcija vezivanja komplemenata (RVK). Primenom AGID testa pozitivni nalazi dobijeni su kod krava sa četiri farme, odnosno kod 13 životinja ili 1,5%. Metodom RVK utvrđeno je 35 serološki pozitivnih krava ili 4,1% (Vidić i sar., 2001). Rezultati naših ispitivanja ukazuju da smo primenom AGID testa i RVK dokazali da postoji paratuberkuloza kod goveda.

DALJI PRAVCI DIJAGNOSTIKE PARATUBERKULOZE

Do sada nijedna dijagnostička procedura koja je dostupna ne omogućava pouzdanu dijagnozu paratuberkuloze na nivou jedinke, posebno u stadima sa niskom prevalencom pozitivnih životinja. Senzitivnost i tačnost dijagnoze mogu se povećati ponovnim testiranjem. Utvrđivanje infektivnog statusa stada je takođe komplikovano. Dokazivanje specifičnih antitela u individualnim uzorcima seruma ili uzorcima mleka iz celog stada je ekonomičan način za utvrđivanje prevalencije. Nekoliko modela (strategije) je testirano za definisanje reprezentativnog uzorka za skrining i monitoring, kao što je dokazivanje antitela u zbirnim uzorcima mleka ili dokazivanje agensa u zbirnim uzorcima fecesa. Nažalost, na osnovu istraživanja utvrđeno je da u zapatima sa niskom prevalencom neće biti registrovana infekcija primenom ovakvog modela, a time monitoring gubi na vrednosti, odnosno nije relevantan.

Širom sveta brojni istraživački timovi čine napore kako bi se poboljšale i razvile nove dijagnostičke metode. Potreban je metod koji omogućava specifičnu dijagnozu kod mladih životinja i tačnu identifikaciju infektivnog statusa jedinke. Dokazivanje izlučivanja agensa fecesom se može pojačati bržim sistemom detekcije i efikasnijim metodom za DNK ekstrakciju iz fecesa. Istraživanja treba da otkriju nove MAP specifične antigene sa potencijalom da se poboljša detekcija antitela ili merenje ćelijskog imuniteta. I pored problema, kontrola paratuberkuloze već sada je moguća, a obezbeđuje se kombinacijom redovne dijagnoze sa striktnim sanitarnim merama i uklanjanjem inficiranih životinja iz zapata.

KONTROLA

Do sada nije pronađen efikasan lek za lečenje paratuberkuloze. Simptomatska terapija sa ciljem redukcije proliva bila je uspešna za izvesno vreme, povremeno rezultira poboljšanjem opšteg zdravstvenog stanja, ali se proliv u skoro svim slučajevima

ponovo javlja. Nedostatak efikasnog leka sa dobrom aktivnošću za MAP i njegovom koncentracijom intracelularno, ne daje nadu da će terapija biti zadovoljavajući metod za suzbijanje paratuberkuloze.

U goveda vakcinacija je vršena samo u teladi mlađe od 1 meseca starosti. Osnovni problem je što su vakcinisane životinje pozitivne na Jonin- test i na tuberkulin-test. U generalnom pogledu, vakcinacija može biti preporučena kod jakih infekcija, tuberkuloza-slobodnih stada, ali samo u područjima gdje je tuberkuloza iskorenjena. Vakcinacija teladi od 5 do 40 dana starosti sa inaktivisanom vakcinom paratuberkuloze rezultira pozitivnom ELISA testom najmanje 15 meseci i to može remetiti program kontrole koji je zasnovan na serološkim testovima.

Nedostatak dovoljno meritornih laboratorijskih testova, dug period inkubacije i mali broj kliničkih slučajeva otežava kontrolu paratuberkuloze. U literaturi je prezentovano nekoliko programa za prevenciju i kontrolu paratuberkuloze. Program kontrole bazira se na smanjenju transmisije agensa na prijemljive životinje, eliminaciji inficiranih životinja, merama higijene i vakcinacije. Efikasnost preporučenih programa zavisila je direktno od eliminacije inficiranih životinja. Konzervativni metod eradikacije zasniva se na identifikaciji izlučivača primenom seroloških metoda i istovremenim klanjem klinički obolelih grla. Jedna varijanta ovog postupka je ispitivanje životinja primenom kulture fecesa i "škartiranja" grla. Kulturno ispitivanje fecesa vrši se svakih 6 meseci i krave sa pozitivnim rezultatom i njihovo potomstvo se eliminišu. Ovim metodom se bolest znatno može smanjiti, ali se ne mogu otkriti svi izlučivači. Metod ima tu prednost da se rano otkrivaju životinje koji izlučuju bakterije i tako se smanjuje zagađivanje okoline.

LITERATURA

1. Bannantine J.P., Baechler E., Zhang Q., Li L., Kapur V.: Genome scale comparison of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis with *Mycobacterium avium* subsp. *avium* reveals potential diagnostic sequences, *Journal of Clinical Microbiology* Apr; 40, 4, 1303-10, 2002.
2. Bugarski D., Lazić S., Petrović T., Jovičin M., Grgić Ž.: Programi praćenja prisustva pojedinih zaraznih bolesti na farmama muznih krava. U: Zbornik referata i kratkih sadržaja Simpozijuma VII epizootiološki dani sa međunarodnim učesćem, Jagodina, 30. mart - 2. april 2005. godine, str. 145-146, 2005.
3. Cousins D.V., Evans R.J., Francis B.R.: Use of BACTEC radiometric culture method and polymerase chain reaction for the rapid screening of faeces and tissues for *Mycobacterium paratuberculosis*, *Aust Veterinary Journal*, Dec, 72, 12, 458-62, 1995.
4. Dargatz D.A., Byrum B.A., Barber L.K, Sweeney R.W., Whitlock R.H., Shulaw W.P., Jacobson R.H., Stabel J.R.: Evaluation of a commercial ELISA for diagnosis

- of paratuberculosis in cattle, *Journal of American Veterinary Medical Association*, Apr 1, 218, 7, 1163-6, 2001.
5. de Juan L, Alvarez J, Romero B, Bezos J, Castellanos E, Aranaz A, Mateos A, Domínguez L.: Comparison of four different culture media for isolation and growth of type II and type I/III *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis strains isolated from cattle and goats, *Applied Environ. Microbiology*, Sep, 72, 9, 5927-32, 2006.
 6. Grgić Ž., Vidić B., Lazić S., Stojanov I.: Paratuberkuloza (Johne-ova bolest). *Veterinarski glasnik*, 50, 7-8, 481-489, 1996.
 7. Grgić Ž., Vidić B., Savić-Jevdendić S., Pušić I.: Ispitivanje prevlence za paratuberkulozu kod goveda na području Južne Bačke i Srema. U: Zbornik kratkih sadržaja, Simpozijum Stočarstvo, veterinarstvo i ekonomika u proizvodnji zdravstveno bezbedne hrane sa međunarodnim učešćem, Herceg Novi, 22-29. jun, 2008, Novi Sad, Poljoprivredni fakultet, 2008, str. 51.
 8. Harris N.B., Robbe-Austerman S., Payeur J.B.: Effect of egg yolk on the detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis using the ESP II liquid culture system, *Journal of Veterinary Diagnostic Invest*, Nov, 17, 6, 554-60, 2005.
 9. Huda A., Lind P., Christoffersen A.B., Jungersen G.: Analysis of repeated tests for interferon-gamma (IFN-gamma) response and faecal excretion for diagnosis of subclinical paratuberculosis in Danish cattle, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Aug 15, 94, 3-4, 95-103, 2003.
 10. Kalis C.H., Hesselink J.W., Russchen E.W., Barkema H.W., Collins M.T., Visser I.J.: Factors influencing the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis from bovine fecal samples, *Journal of Veterinary Diagnostic and Invest*, Jul, 11, 4, 345-51, 1999.
 11. Kalis C.H., Collins M.T., Hesselink J.W., Barkema H.W.: Specificity of two tests for the early diagnosis of bovine paratuberculosis based on cell-mediated immunity: the Johnin skin test and the gamma interferon assay, *Veterinary Microbiology*, Dec 2, 97, 1-2, 73-86, 2003.
 12. Möbius P., Hotzel H., Rassbach A., Köhler H.: Comparison of 13 single-round and nested PCR assays targeting IS900, ISMav2, f57 and locus 255 for detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis, *Veterinary Microbiology*, Jan 25, 126, 4, 324-33. Epub 2007 Jul 25, 2008
 13. Nielsen S.S., Kolmos B., Christoffersen A.B.: Comparison of contamination and growth of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis on two different media, *Journal of Applied Microbiology*, 96, 1, 149-53, 2004
 14. Robbe-Austerman S., Krull A.C., Stabel J.R.: Time delay, temperature effects and assessment of positive controls on whole blood for the gamma interferon ELISA to detect paratuberculosis, *Journal Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, Jun, 53, 5, 213-7, 2006.

15. Stabel J.R., Bannantine J.P.: Development of a nested PCR method targeting a unique multicopy element, ISMap02, for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fecal samples, *Journal of Clinical Microbiology*, Sep, 43, 9, 4744-50, 2005.
16. van Weering H., van Schaik G., van der Meulen A., Waal M., Franken P., van Maanen K.: Diagnostic performance of the Pourquier ELISA for detection of antibodies against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in individual milk and bulk milk samples of dairy herds, *Veterinary Microbiology*, Nov 15, 125, 1-2, 49-58. Epub 2007 May 18, 2007.
17. Vidić B., Grgić Ž., Bjelajac B., Trkulja R.: Ispitivanje rasprostranjenosti paratuberkuloze u goveda (Examining prevalence of paratuberculosis in cattle). U: Zbornik referata i kratkih sadžaja, Simpozijum 'III jugoslavenski epizootiološki dani', Kladovo, 18-21. aprila 2001. godine, Beograd, Veterinarska komora Srbije, 2001, str. 133.
18. Vidić B., Boboš S.: Paratuberkuloza u goveda. U: Zbornik radova i kratkih sadržaja, '13. Savetovanje veterinarara Srbije', Zlatibor 11-14.09.2001, Beograd, Srpsko veterinarsko društvo, 2001, str. 211-214.
19. Vidić B., Grgić Ž., Bjelajac B., Trkulja R.: Ispitivanje rasprostranjenosti paratuberkuloze kod goveda i ovaca. *Veterinarski glasnik*, 55, 1-2, 9-16, 2001.
20. Vidić B., Boboš S., Grgić Ž.: Paratuberkuloza u goveda. *Savremena poljoprivreda*, 51, 3-4, 273-277, 2002.

Primljeno: 15.05.2010.

Odobreno: 17.06.2010.