STÁTNÍ VETERINÁRNÍ ÚSTAV JIHLAVA
Referenční laboratoř pro bovinní virovou diarrhoeu (BVD/MD)
Oddělení virologie
Rantířovská 93, 586 05 Jihlava
Tel.: +420 567 143 263, Fax: +420 567 143 262, Web: www.svujihlava.cz, E-mail: virologie@svujihlava.cz

OZDRAVOVACÍ PROGRAM od BOVINNÍ VIROVÉ DIARHOE (BVD)

MVDr. Petr VÁCLAVEK, Ph.D.

MVDr. Pavel BARTÁK, Ph.D.

2011

Obsah:

A. Charakteristika původce nákazy

1. Úvod
2. Etiologie
3. Diverzita pestivirů
4. Projevy infekce BVD – definice pojmů

B. Princip ozdravování od BVD (program kontroly a eradikace infekce BVD)

1. Identifikace chovu - určení nákazového statusu stáda
2. Detekce a eliminace zdroje infekce – identifikace perzistentně infikovaných (PI) zvířat a jejich odstranění z chovu
3. Preventivní opatření - monitoring po odstranění PI zvířat a systém preventivních opatření pro zamezení reinfekce ozdraveného chovu
4. Certifikace chovu

C. Diagnostické metody při ozdravování od BVD

1. Detekce protilátek proti viru BVD – sérologie
2. Detekce viru / antigenu / genomu BVDV – virologie

D. Kritické body ozdravování od BVD

E. Vakcinace

F. Alternativní postupy identifikace PI zvířat

G. Literatura

A. Charakteristika původce nákazy

1. Úvod

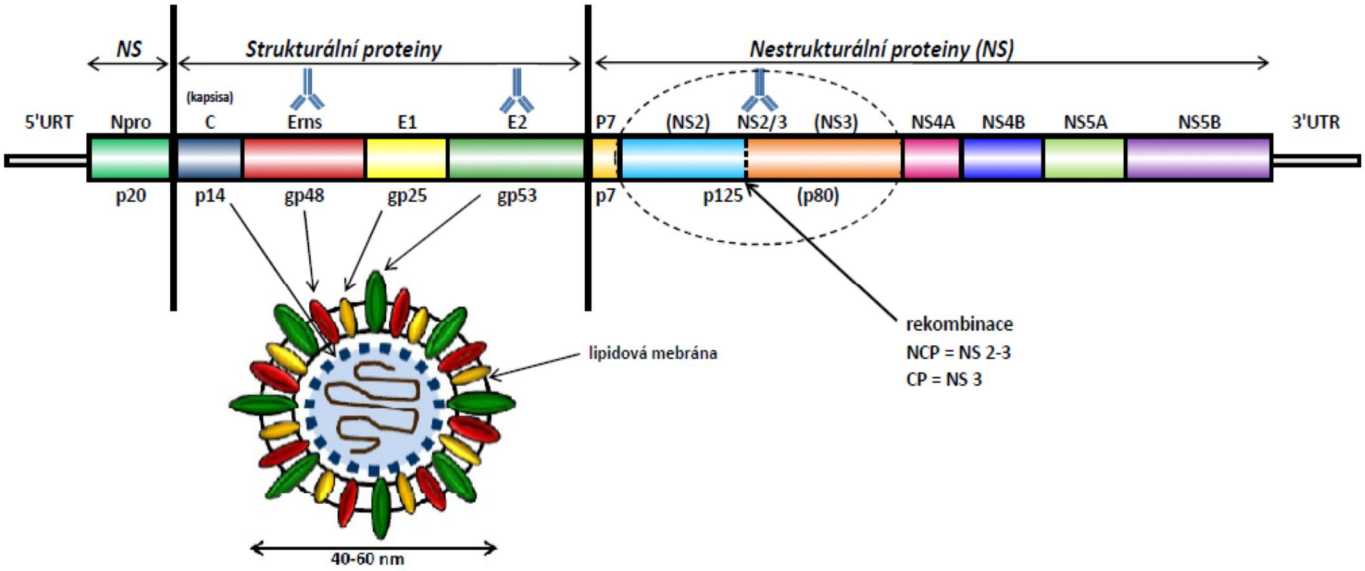
Bovinní virová diarrhoea (BVD-MD) je celosvětově rozšířené infekční virové onemocnění, které způsobuje významné ekonomické ztráty v chovech skotu. Infekce virem BVD se může projevovat širokou škálou klinických příznaků ve všech věkových kategoriích a je dávána do souvislosti reprodukčními problémy, imunosupresí, onemocněním respiratorního aparátu, GIT i CNS. Onemocnění způsobené virem BVD probíhá většinou subklinicky, zřídka za těžších klinických příznaků nebo fatálně. Zcela v rozporu s názvem se infekce virem BVD jen výjimečně projevuje průjmem. V takovém případě se jedná o zhoubnou formu nemoci, jež se označuje jako slizniční choroba skotu a je charakterizovaná četnými erozemi na sliznicích dutiny ústní, zákalem rohovky, krvavým průjmem a úhynem i dospělého skotu. Infekce virem BVD ovlivňuje negativně funkce imunitního systému, což vede ke zvýšené vnímavosti k jiným patogenům. Časté jsou pak sekundární infekce např. bovinním respiratorním syncytiálním virem (BRSV), *Mannheimia haemolytica*, rotavirem typu A, apod. Infekce BVD také často příčinou významných ztrát v reprodukci skotu. Virus prostupuje placentou a v závislosti na stádiu březosti se infekce může projevit sníženou mírou zabřezávání, ranou embryonální odúmrtí plodu, aborty, porody telat se sníženou životaschopností a kongenitálními vadami telat či vznikem telete perzistentně infikovaného.

Infikovaná zvířata při akutní či perzistentní formě infekce šíří virus všemi exkrety a sekrety a choroba tak může být přenášena jak přímým kontaktem zvířat, tak kontaminovanými jehlami či jinými pomůckami. Specifickým projevem infekce virem BVD jsou **perzistentně infikovaní jedinci**, kteří vznikají transplacentární infekcí plodu v prvním trimestru březosti necytopatogenním virem BVD, kdy imunitní systém plodu ještě není schopen identifikovat cizorodé agens a virus BVD je akceptován jako homologní antigen. Perzistentně infikovaná zvířata jsou celoživotními šiřiteli viru. **Eliminace perzistentně infikovaných zvířat z chovu a prevence před vznikem nových perzistentně infikovaných zvířat jsou základními principy k ozdravení chovu skotu od BVD.**

V Evropě je BVD virus endemicky rozšířen. První ozdravovací programy začaly v letech 1993-1994 ve Skandinávských zemích a tyto země jsou nyní již z velké části prosté od BVD. V současné době probíhají povinné národní ozdravovací programy v Německu, Švýcarsku a Rakousku, dále pak více či méně dobrovolné programy v některých regionech Itálie, Holandska, Belgie, některých departmentech Francie, v Anglii, v některých regionech Řecka a Španělska. V České republice lze pozorovat vzrůstající trend zájmu o ozdravení od BVD a je pravděpodobné, že v souvislosti s ozdravením chovů od IBR se bude zvyšovat zájem i o ozdravení od BVD. V současné epizootologické situaci u nás nejsou jednoduché podmínky chovů ozdravených od BVD, neboť kvůli vysoké prevalenci může u takových chovů snadno dojít k reinfekci. Základem úspěchu při ozdravení od BVD jsou kvalitně vypracovaný ozdravovací program pro daný chov, důsledná realizace programu a následný monitoring po odstranění PI zvířat se systémem preventivních opatření pro zamezení reinfekce ozdraveného chovu. Nezbytná je součinnost diagnostické laboratoře s chovatelem a soukromým veterinárním lékařem daného hospodářství, případně referenční laboratoří.

2. Etiologie

- Původcem nákazy je virus bovinní virové diarrhoe (BVDV) = RNA virus *čeledi Flaviviridae - rod* ***Pestivirus***
- dva **biotypy** viru - **cytopatogenní a necytopatogenní** (**CP – BVD**, **NCP – BVD**)
- NCP BVDV je dominantní biotyp – více než 90% izolátů je NCP
  - více imunogenní = větší protilátková odpověď = vyšší titr neutralizačních protilátek
  - virémie s vysokým vylučováním viru oproti CP BVD
- afinita viru k lymforetikulární tkáni = alterace imunitního sytému = **imunosuprese**
- přirozeně vnímavý k viru BVDV je skot. Choroba je přenosná i na ostatní přežvýkavce a prasata. Z volně žijících zvířat se mohou nakazit především jelenovití.

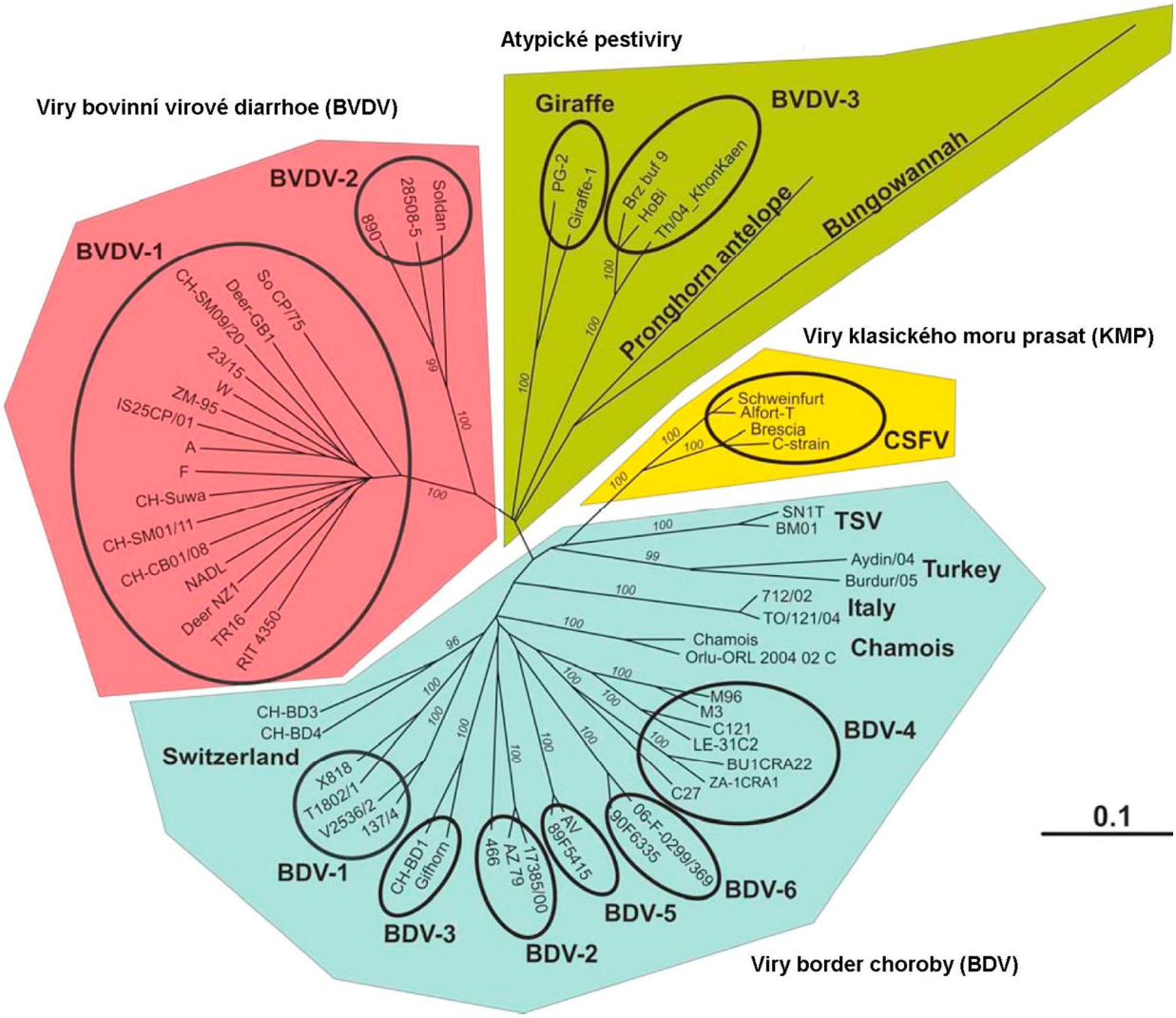


Obr. č. 1 Virus BVDV, genom a proteiny viru (Václavek, 2010)

3. Diverzita pestivirů

- jsou popsány dva **genotypy viru BVD** – **BVDV typ 1** a **BVDV typ 2**
- dále je popsáno 16 subgenotypů BVD 1 a 3 subgenotypy BVD 2
- BVDV = RNA virus náchylný k mutacím a rekombinacím
- Prevalence genotypů BVDV-1 a BVDV-2 se liší po celém světě: okolo 50% izolátů v Severní Americe je BVD-2, zatímco BVD-1 dominuje Evropě s více než 90%. Doposud byl typ BVD-2 popsán v Evropě v Německu, Belgii, Francii, Nizozemí, Rakousku, Slovensku, Itálii, a Velké Británii. V České republice zatím nebyl typ BVD-2 oficiálně referován, ale předpokládá se, že se zde v malé míře také vyskytuje.
- BVDV-1 způsobuje shodné onemocnění jako BVDV-2. Výjimkou jsou některé vysoce patogenní kmeny BVDV-2 způsobující letální hemoragický syndrom u mladého dobytka.

- Genetické/antigenní rozdíly mezi kmeny BVDV a mezi dalšími příbuznými pestiviry je nutno brát v úvahu vzhledem k diagnostickým metodám a vzhledem k vakcínám (vývoj vakcín, jejich efektivita potenciální kontaminace vakcín).
- Vakcíny obsahují různé kmeny BVDV a to jak různé biotypy, tak genotypy 1 a 2. Efektivita vakcinace může být ovlivněna antigenní diverzitou viru BVDV v případě, že se virus vakcinační výrazně odlišuje od viru terénního.



Obr. č 2. Klasifikace pestivirů - fylogenetická analýza založená na N^{pro} sekvenci (upraveno, *E. Petrhans et al. Vet. Res. (2010) 41:44, www.vetres.org)*

4. Projevy infekce BVD/MD – definice pojmů

- **klinická infekce**
  - mírné subklinické infekce s alterací imunitního systému - potencují intenzitu klinických projevů průjmových a respiratorních onemocnění, projevuje se zvýšenou nemocností i ztrátami úhynem
  - letální hemoragický syndrom u mladého dobytka způsobený některými kmeny BVDV-2

- **fatální kongenitální infekce** - infekce plodu zejména v raném stadiu březosti způsobují odumření plodu a následné zmetání; mrtvě narozená nebo defektní telata s malformacemi či postižením CNS.

- **slizniční choroba** – vzácná klinická forma, která se vyvine **pouze u PI zvířat** po superinfekci heterologním cytopatogenním kmenem viru nebo po mutaci homologního necytopatogenního biotypu na cytopatogenní. Zhoubná forma nemoci, charakterizovaná četnými erozemi, ulceracemi a nekrózami na sliznicích dutiny ústní, zákalem rohovky, krvavým průjmem, dehydratací a úhyny i u dospělého skotu.

- **transientní virémie (TI)** – **virémie při akutní infekci**. Přítomnost viru v krvi je obvykle možno detekovat v rozmezí 5 -16 dnů.

- **perzistentní infekce (PI)** - vzniká při infekci plodu v prvním trimestru březosti, kdy nedojde ke zmetání. Imunitní systém plodu není ještě schopen identifikovat cizorodé agens a virus BVD je akceptován jako homologní antigen a udržuje se v lymfatickém systému a leukocytech periferní krve po celou dobu života zvířete. Další informace o **PI zvířatech** viz níže.

B. Princip ozdravování od BVD

Principem kontroly a ozdravování chovu skotu od BVD je vyhledání a eliminace zdrojů infekce tzn. perzistentně infikovaných zvířat a znemožnění vzniku nových PI zvířat. PI zvířata, tj. perzistentní nosiči viru BVD, masivně vylučují virus do prostředí a jsou hlavním faktorem umožňujícím cirkulaci viru ve stádě. Ozdravování je realizováno na základě ozdravovacího programu.

Perzistentně infikované (PI) zvíře:

- infikované v prvním trimestru březosti ncp virem BVD, kdy imunitní systém plodu ještě není schopen identifikovat cizorodé agens a virus BVD je akceptován jako homologní antigen
- podíl PI zvířat ve stádě je **0,5-2%**
- PI telata mohou vykazovat různé abnormity, jako např. nízkou porodní hmotnost nebo tzv. „kadeřavou“ srst, obvykle však jsou bez jakýchkoli příznaků a mohou být identifikována pouze laboratorním vyšetřením
- imunosuprese - náchylnost k infekcím jinými mikroorganismy
- riziko vzniku slizniční formy onemocnění (MD)
- **celoživotní vylučování viru** - masivně vylučují virus do prostředí, jsou hlavním faktorem umožňujícím cirkulaci viru BVD ve stádě
- **jsou imunotolerantní vůči kmenu viru, kterým jsou infikováni**
- **jsou však imunokompetentní vůči jiným antigenním podnětům** včetně jiných terénních a vakcinačních kmenů viru BVD antigenně odlišných, popř. vůči jiným příbuzným pestivirům
- z hlediska diagnostiky jsou jako PI zvířata posuzovány kusy opakovaně pozitivní v testu na přítomnost viru BVD v odstupu minimálně 3 týdnů.

Program kontroly a eradikace infekce BVD by měl zahrnovat tato body:

1. **Identifikace chovu - určení nákazového statusu stáda**
2. **Detekce a eliminace zdroje infekce – identifikace perzistentně infikovaných (PI) zvířat a jejich odstranění z chovu**
3. **Preventivní opatření - monitoring po odstranění PI zvířat a systém preventivních opatření pro zamezení reinfekce ozdraveného chovu**
4. **Certifikace chovu**

1. Identifikace chovu

Na základě výsledků vyšetření níže popsanými postupy lze identifikovat chovy určením **nákazového statusu stáda** takto:

- ***neidentifikovaný chov*** - chov s neprověřenou nákazovou situací s možným výskytem BVD virologicky či sérologicky pozitivních zvířat a PI zvířat.

- ***chov s aktivní infekcí*** - chov s výskytem séropozitivních zvířat, akutně viremických zvířat popř. PI zvířat, identifikovaný na základě laboratorního vyšetření stanovenými metodami průkazu viru a protilátek.

- ***chov prostý PI zvířat*** - chov identifikovaný na základě stanovených metod průkazu viru s negativním výsledkem vyšetření všech zvířat základního stáda, zvířat nově zařazovaných do stáda a telata narozených v průběhu 12-15 měsíců od vyřazení posledních identifikovaných PI zvířat – tzn. chov, v němž nebyla zjištěna přítomnost PI zvířat nebo z nějž již byla všechna PI zvířata eliminována.

- ***chov prostý BVD*** - chov sérologicky a virologicky negativní

Určení nákazového statusu je možné provést v podstatě třemi postupy:

a) stanovením hladiny protilátek ve vzorcích krve od indikátorových skupin zvířat (metody ELISA a NPLA)

Jedná se o vzorky sér od 6–10 ks zvířat několika věkových skupin.

- telata ve stáří 6-8 měsíců,
- jalovice ve stáří 14-16 měsíců,
- prvotelky nejdříve 1 měsíc po otelení,

U stád do 300 ks. skotu se doporučuje odebrat vzorky od 6 ks. zvířat z každé skupiny, u stád nad 300 ks 10 zvířat z každé skupiny. U stád do 10 ks skotu se vyšetří 50-100% skotu. **Výsledné vysoké procento pozitivity a vysoké titry protilátek indikují chov s aktivní infekcí a pravděpodobnou přítomnost PI zvířat**.

V hospodářství bez aktivní infekce se provede za 5-7 měsíců opakované vyšetření indikátorových zvířat ve stejném rozsahu jako při prvním screeningovém vyšetření a provede se vyšetření bazénového vzorku mléka na přítomnost protilátek. Pokud je výsledek obou vyšetření negativní, lze hospodářství definovat **jako prosté BVD-MD**

b) stanovení protilátek v bazénovém vzorku mléka (metoda ELISA)

K vyšetření se použije bazénový vzorek mléka (dále jen BVM). V případě pozitivního výsledku vyšetření se provede doplňkové sérologické vyšetření indikátorových zvířat (viz odst. a). Důvodem je, že v mléce mohou přetrvávat protilátky určitou dobu i po vyřazení PI zvířat.

c) ***průkaz viru ve směsném vzorku krevního séra nebo bazénovém vzorku mléka*** **(metody - RT-PCR a Real-Time RT-PCR)**

Použije se zejména v případě vakcinovaných stád.

Pozn.: **Sérologická vyšetření nelze použít ve vakcinovaných stádech**. U vakcinovaných stád lze k určení nákazového statusu použít např. průkaz viru ve směsném vzorku krevních sér nebo v BVM. O postupu vyšetření (a, b nebo c)) rozhodne laboratoř, která bude provádět diagnostiku po konzultaci s chovatelem a soukromým veterinárním lékařem daného hospodářství, případně referenční laboratoří.

2. Detekce a eliminace zdroje infekce – identifikace perzistentně infikovaných (PI) zvířat a jejich odstranění z chovu

Za účelem identifikace perzistentně infikovaných (PI) zvířat se testují metodou detekce viru (viz kapitola C.) všechna zvířata základního stáda, zvířata nově zařazovaná do stáda a telata narozená v průběhu 12-15 měsíců od vyřazení posledního PI zvířete.

Jako PI zvíře lze označit to, které bylo opakovaně (2x) virologicky pozitivní v odstupu alespoň 21 dní.

Všechna PI zvířata musí být bezprostředně po potvrzení vyřazena na jatky.

Metody průkazu viru, včetně indikací a limitů jednotlivých metod, jsou uvedeny kapitole C.

3. Preventivní opatření - monitoring po odstranění PI zvířat a systém preventivních opatření pro zamezení reinfekce ozdraveného chovu

3.1 Monitoring ozdraveného chovu po odstranění PI zvířat

Po odstranění posledního PI zvířete z chovu má chov status ***chov prostý PI zvířat*** (viz výše – *B.1. Identifikace chovu*). K získání statusu ***chovu prostého BVD*** musí být chov virologicky i sérologicky negativní.
První sérologicky negativní skupina zvířat po odstranění posledního PI zvířete bývají telata ve stáří 6-8 měsíců po definitivním vymizení kolostrálních protilátek. Dospíváním těchto séronegativních zvířat takto postupem času dochází v chovu u všech věkových kategorií k vymizení protilátek proti viru BVD.

Chov prostý PI zvířat je dále laboratorně kontrolován v průběžném monitoringu. Monitoring je založen na **laboratorním vyšetření (ELISA Ab testem, NPLA) na přítomnost protilátek proti viru BVD**:

1) Sérologicky se vyšetřují nejprve indikátorová zvířata v kategorii **telat ve stáří 6-12 měsíců** - indikátorová skupina 6-10 zvířat 1-2x ročně (ihned po odstranění PI zvířat).
2) Dále se pak s odstupem šesti měsíců vyšetřují sérologicky **jalovice ve stáří 12-16 měsíců** - indikátorová skupina 6-10 zvířat 1-2x ročně.
3) A nakonec s odstupem dalších šesti měsíců vyšetřujeme i **prvotelky** - indikátorová skupina 6-10 zvířat 1-2x ročně.

Popř. lze vyšetřovat další indikátorová zvířata:

- bazénové vzorky mléka (virologicky, popř. sérologicky) - 1x ročně.
- krávy zmetalky – průběžně

V hospodářstvích v nichž je chováno do 50 ks skotu se vyšetří 50 % zvířat.

Postup monitoringu je vhodné v daném chovu individuálně nastavit ve spolupráci s laboratoří, která provádí diagnostiku a po konzultaci s chovatelem a soukromým veterinárním lékařem daného hospodářství, případně referenční laboratoří.
Pokud nejsou opakovaně během minimálně 2 letého monitoringu prokázány protilátky proti původci BVD-MD v mladších kategoriích skotu (telata, jalovice, prvotelky), je možné hospodářství považovat za **definitivně bez aktivní infekce BVD** a chov může získat **status chovu prostého BVD.**

Pokud se chovatel rozhodne po odstranění PI zvířat **vakcinovat**, je vhodné kvůli sérologickému monitoringu vyčlenit několik zvířat - telat (např. indikátorová skupina 10 zv.), které se nevakcinují a jako **sentinely** je pak možné tato zvířata průběžně sérologicky testovat.

3.2 Preventivní opatření pro zamezení reinfekce BVD-MD prostého stáda

Rizika zavlečení infekce do BVD prostého stáda:

- **nákup neprověřených zvířat** – např. **březí plemenice s intrauterinně infikovaným fétem, tzv. „trojské krávy**“, **mladí plemenní býčci** přemisťovaní za účelem přirozené plemenitby do stáda apod.

- **inseminační dávky** nakoupené v zahraničí, které nepochází ze schválených středisek pro odběr spermatu a neposkytují zdravotní garance dle **směrnice Rady 88/407/EHS.** Při zabezpečování inseminace je nutné požadovat, aby inseminační dávky pocházely ze středisek pro inseminaci skotu resp. středisek pro skladování spermatu, která plní ustanovení Vyhlášky č.380/2004 Sb. (pokud byla inseminační dávka vyrobená v ČR), resp. ustanovení směrnice Rady 88/407/EHS pokud se jedná o inseminační dávky vyrobené v zahraničí.

- **nedodržování monitoringu** - chovatel ve stádě v prostém BVD **neprovádí či zastaví následný monitoring** v době např. regionálního nákazového rizika apod.

- **biologické služby** – osoby a zaměstnanci vstupující do chovu provádějící zákroky a úkony, při kterých může dojít k přenesení viru z jiného chovu (inseminační technik, úprava paznehtů, veterinární lékař apod.)

- dále viz níže – kapitola D. Kritické body ozdravování

4. Certifikace chovu

Udělení certifikátu chovu prostého BVD (viz bod 3.1) na základě stanovených kritérií určeným orgánem (veterinární služba, chovatelský svaz, plemenářská služba), který bude k tomuto účelu pověřen.

C. Diagnostické metody při ozdravování od BVD (metody schválené RL)

1. Detekce protilátek proti viru BVD – sérologie

ELISA test na detekci protilátek (ELISA Ab)

Princip	**průkaz protilátek ELISA testem** (nepřímý, blokovací)
Materiál (vzorky)	sérum, plazma, mléko, bazénové mléko
Hlavní využití testu	**screening, identifikace chovu** - určení statusu, vyšetření indikátorových skupin, **monitoring** - kontrola chovu po ozdravení.
Limity testu	Nutná opatrnost při interpretaci výsledků. Jen samotný test ELISA Ab by neměl sloužit k definitivní diagnóze. Možnost výskytu PI zvířete s protilátkami. **Nepřímý ELISA test využitelný od 6. měsíce stáří zvířat**, NS3 blokovací ELISA test až od 12. měsíce stáří zvířete.

NPLA nebo VNT

Princip	**průkaz protilátek neutralizačním imunoperoxidázovým testem** (NPLA) nebo virus neutralizačním testem (VNT)
Materiál (vzorky)	sérum, plazma
Hlavní využití testu	**screening**, **sérokonverze** (využití párových vzorků), stanovení titru, vysoké titry indikují silnou imunitní odezvu, diferenciace kmenů BVDV, výzkum
Limity testu	Test NPLA (stejně tak jako ELISA testy) nerozlišuje mezi přirozenou imunitou, mezi protilátkami získanými vakcinací popř. mezi mateřskými protilátkami. Vyšší náročnost testu.

2. Detekce viru / antigenu / genomu BVDV – virologie

E^{RNS} ELISA test na detekci antigenu (E^{RNS} Ag ELISA)

Princip	**průkaz virového antigenu ELISA testem**
Materiál (vzorky)	krevním sérum, plazma, plná krev, suspenze orgánů, kožní biopsie (ušní výkroje), suspenze leukocytů periferní krve
Hlavní využití testu	**detekce PI a TI zvířat**, diagnostika klinické BVD/MD, screening, kontrola plemenných býků, kontrola při prodeji a nákupu, monitoring
Limity testu	Při detekci antigenu z krve je možné využití E^{RNS} ELISA testu u vzorků odebraných **před příjmem kolostra nebo až po 60 d.p.p. Bez omezení je možno tento test použít při testování kožních biopsií** či vzorků orgánů. Potřeba opakovaného odběru pozitivního vzorku pro potvrzení, zda se jedná o PI nebo TI zvíře. Cenově nákladnější, ale rychlejší test než testování směsných vzorků v PCR.

NS3 ELISA test na detekci antigenu (NS3 Ag ELISA)

Princip	**průkaz virového antigenu ELISA testem**
Materiál (vzorky)	separovaná suspenze leukocytů periferní krve
Hlavní využití testu	**detekce PI a TI zvířat**, diagnostika klinické BVD/MD, screening, kontrola plemenných býků, kontrola při prodeji a nákupu, monitoring
Limity testu	NS3 ELISA k detekci antigenu BVDV je vhodný **jen na testování separovaných leukocytů periferní krve a u vzorků odebraných před příjmem kolostra nebo až po 90 d.p.p.** Při optimalizaci testu (odběru vzorku) lze tento test použít až do tří dnů po narození. Potřeba opakovaného odběru pozitivního vz. pro potvrzení, zda se jedná o PI nebo TI zvíře. Cenově nákladnější, ale rychlejší test než je testování směsných vzorků metodou PCR.

Izolace viru

Princip	**izolace viru na tkáňových kulturách** a jeho následná detekce metodou PLA
Materiál (vzorky)	biologický materiál (orgány, tělní tekutiny, sekrety a exkrety, leukocyty)
Hlavní využití testu	konfirmace, diferenciace kmenů BVDV a diferenciace pestivirů, výzkum
Limity testu	Izolace nespolehlivá od příjmu kolostra do cca 40. dnem po porodu (d.p.p.). Vysoká cena a délka testu (dlouhá inkubace).

RT-PCR a Real-Time RT-PCR (polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí)

Princip	**průkaz virové RNA testem RT-PCR** a **Real-Time RT-PCR**; metody detekující všechny známé varianty viru BVD + nutná analytická senzitivita min. 100 genom. kopií/reakci
Materiál (vzorky)	krevní sérum, krevní plazma, leukocyty, plná krev, mléko, bazénové mléko, biopsie (ušní štěpy), sekční materiál, tkáně, kožní
Hlavní využití testu	**detekce PI a TI zvířat**, diagnostika klinické BVD/MD, monitoring, identifikace chovu - určení statutu chovu screening, monitoring - kontrola chovu po ozdravení
Limity testu	**Možnost slučování vzorků (směsné vzorky) - směs 5 až 50 vz**. (krevní sérum, krevní plazma, leukocyty, plná krev, ušní štěpy). Potřeba opakovaného odběru pozitivního vzorku pro potvrzení, zda se jedná o PI nebo TI zvíře. **Limitováno pro směsné vzorky krve odběrem vz. do 7. d.p.p. nebo až po 40 d.p.p.** (pro testování **jednotlivých vzorků bez omezení).** U biopsie (**ušní štěpy**) možno využít **bez věkového omezení.** **U bazénového mléka** nelze identifikovat jednotlivé PI zvířata, ale přítomnost PI zvířat (zvířete) ve skupině zvířat, která se podílejí na nádoji do daného bazénu (**limit do 200 zvířat**).

V rámci výše popsaných metod by měly být používány metody (popř. diagnostické soupravy) validované a schválené RL pro BVD.

D. Kritické body ozdravování od BVD

1) **precizní administrativa** – identifikace jednotlivých kusů, přehledně a správně vyplněné žádanky zasílané do laboratoře, správné označení vzorků, čitelná čísla zvířat = vyloučení záměny.

2) **odběr vzorku** – nutné zachování identity vzorku, zabránění kontaminace při odběru vzorků (např. odběr krve jednou jehlou, odběr ušních výkrojů bez použití jednorázových pomůcek), preferovat jednorázové odběrové soupravy. Využití vrubovacích kleští na odběr kožních biopsií z ucha může vést ke křížové kontaminaci vzorků virem BVD nebo naopak k falešně negativnímu výsledku při kontaminaci vzorku dezinfekčním roztokem.

3) **eliminace PI zvířat** – PI zvířata by měla být z chovu odstraněna pokud možno co nejdříve – dříve než přijdou do kontaktu s březími zvířaty – přerušení infekčního řetězce. Využití kožních biopsií z ucha telete usnadňuje včasné vyřazení PI zvířat z chovu (není limitováno mateřskými protilátkami).

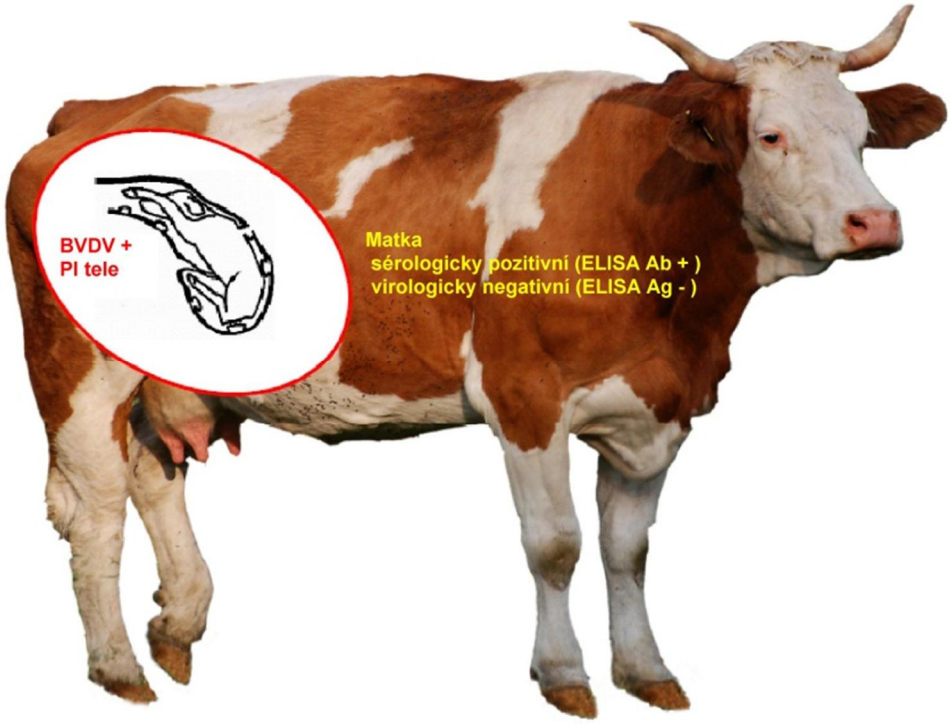
4) **biosecurity** – **ochrana před reinfekcí chovu** – systematický program ochrany před reinfekcí a permanentní **monitoring** i v případě, že záhy po vyřazení posledního PI zvířete začne probíhat v chovu vakcinace.

5) **testování býčků** – i v případě, že zůstávají v chovu jen krátkou dobu. Při nákupu plemeníka, který bude zabezpečovat přirozenou plemenitbu ve stádě bez aktivní infekce (byla eliminována PI zvířata) nebo v BVD prostém hospodářství (stádu), trvat na sérologickém i virologickém vyšetření s negativním výsledkem.

6) **kolostrální protilátky** – vysoké titry kolostrálních protilátek v prvních měsících po porodu mohou způsobit falešně negativní výsledek v některých testech na detekci viru BVD z krve zvířat. Vysoké titry mateřských protilátek blokují vylučování viru a může dojít k falešně negativnímu výsledku při testování séra v ELISA testu i při testování směsných vzorků v testu PCR. Tomu lze předejít změnou matrice – např. testováním **kožních biopsií (ušní štěpy).**
   Při detekci antigenu z krve je možné využití E^{RNS} ELISA testu jen u vzorků odebraných před příjmem kolostra nebo až po 60 d.p.p. Test PCR je u vzorků krve limitován pro směsné vzorky odběrem vz. do 7. d.p.p. nebo až po 40 d.p.p.. (u jednotlivých vzorků bez omezení). Testování ušních štěpů je bez věkového omezení v ELISA Ag testu i v testu PCR.

7) **nákup zvířat** - **kontrola nově nakoupených zvířat** – karanténa s negativními laboratorními testy na BVDV – potvrzení, zda se nejedná o PI zvíře či „trojskou krávu“. Chovatelé skotu, kteří již nemají ve svém stádě aktivní infekci (byla eliminována PI zvířata) nebo docílili BVD prostého statusu, musí při jakémkoli přesunu skotu do svého stáda **vyžadovat nákazové garance**.

8) **„trojská kráva“** – sérologicky pozitivní, ale virologicky negativní kráva, s PI plodem – nutno vyšetřit tele po narození (nebezpečí při nákupu březích zvířat). Nákup sérologicky pozitivní březí jalovice (krávy), (přestože je virologicky negativní) je největším nebezpečím, a nejčastější cestou reinfekce ozdraveného stáda. V takových případech je nutno tele po porodu izolovat od všech zvířat a provést vyšetření ušního štěpu. Při pozitivním nálezu vyřadit tele co nejdříve po narození.



9) **bazénové vzorky mléka** – jsou reprezentativní jen pro ta zvířata, která se podílejí na nádoji do daného bazénu. V případě pozitivního průkazu viru BVD v bazénovém vzorku mléka je nutné odebrat krve všech krav, které se podílely na daném nádoji (bazénu) a vyšetřit je dále testem na průkaz viru a dohledat tak PI zvířata. Pro úspěšnou identifikaci je třeba zajistit dokonalou evidenci krav obsažených v nádoji jednotlivých bazénových vzorků a evidenci krav, které se na nádoji nemohly z různých důvodů podílet (suchostojné, s mastitidami, s ATB apod.).

10) **informovanost - nové poznatky** o chorobě vyvrací **nepravdy** typu:

„… PI zvířata se nedožijí vysokého věku…“, „… PI zvíře poznáme bez laboratorní diagnostiky podle špatné kondice, vzrůstu a časté nemocnosti…“, „ … PI zvíře je vždy sérologicky negativní…“… apod.

PI zvíře nemusí být vždy sérologicky negativní ⇒ výjimky:

- PI telata s pasivně přijatými protilátkami v kolostru do stáří cca 3-6 měsíců
- PI zvířata ve vakcinovaných chovech
- PI zvíře, které se infikuje jiným typem viru BVD, než který získalo při primoinfekci
- PI zvíře po styku infekci příbuzným pestivirem (např. BVD-3, Border disease virus)

11) **přesnost laboratorních testů** – výběr laboratoře, možnosti diagnostiky, specifita a senzitivita testů, limity požívaných testů, konfirmace, kruhové testy

E. Vakcinace

Jako preventivní opatření pro zvýšení úrovně biosecurity u chovů s vysokým rizikem reinfekce je vhodné provádět **vakcinaci jalovic po dobu 1-2 let po odstranění PI zvířat**. K tomuto účelu musí být použity vakcíny k tomuto účelu určené a registrované pro použití v ČR. Způsob aplikace a vakcinační schéma se řídí dle návodu výrobce.

F. Alternativní postupy identifikace PI zvířat

- ***vyhledání BVD PI zvířat s využitím bazénového vzorku mléka (BVM):***

Postup: jsou testovány bazénové vzorky mléka z nádoje od laktujících krav a zároveň krve všech suchostojných krav základního stáda a jalovic testem PCR na přítomnost viru BVD – bazénové vzorky mléka (do 200 ks v bazénu) a směsné vzorky séra (do 50 ks ve vzorku). V případě průkazu viru BVD v bazénovém vzorku mléka je nutné odebrat krev všech krav, které se podílely na daném nádoji – bazénu a vyšetřit je dále testem na průkaz viru a dohledat tak PI zvířata. Pro úspěšnou identifikaci je třeba zajistit **dokonalou evidenci krav obsažených v nádoji jednotlivých bazénových vzorků a evidenci krav které se na nádoji nemohli z různých důvodů podílet (suchostojné, s mastitidami, apod.).**

Tímto postupem je možno dosáhnout stejného výsledku jako při testování vzorků krve, ale za snížení nákladů na základní testaci a to o cca 1600 – 4800 Kč v závislosti na velikosti chovu. Míra úspory je též závislá na počtu virologicky negativních/pozitivních bazénových vzorků mléka. V extrémním případě (všechny bazény jsou pozitivní na přítomnost viru BVD) se může testace bazénových vzorků naopak prodražit.

- ***vyhledání BVD PI zvířat sérologickým vyšetřením a následným virologickým vyšetřením sérologicky negativních zvířat:***

Postup: vyšetří se krevní séra všech zvířat od věku šesti měsíců po porodu ELISA testem na přítomnost protilátek proti viru BVD. Následně se vyšetří na přítomnost viru ELISA Ag testem jen zvířata s negativními výsledky předchozího sérologického vyšetření.

Při tomto postupu je třeba vzít v úvahu **možnosti opomenutí PI zvířat při základní identifikaci**. Tento postup vychází ze starší hypotézy, že PI zvíře je vždy sérologicky negativní. Podle současných poznatků mohou PI zvířata imunitně reagovat tvorbou protilátek na antigenní podnět jiným kmenem viru BVD a mohou tak při této metodice zůstat ve skupině sérologicky pozitivních dále netestovaných zvířat. Navíc v tomto modelu multiplikujeme diagnostickou chybu dvouúrovňovým testováním na rozdíl od jednostupňového přímého průkazu viru. Nutno též poznamenat, že tento alternativní potup nelze využít v chovech, kde probíhá vakcinace BVD.

Vzhledem k tomu, že je **tato metodika vyhledávání PI zvířat nespolehlivá a může zde snadno dojít k „úniku“ PI zvířete, referenční laboratoř pro BVD tento postup neprovádí a ani ho**

nedoporučuje. Tuto metodiku jako rizikovou popisuje také OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2008). V národních programech na ozdravení od BVD, které v současné době probíhají v Evropě (Německo, Švýcarsko, Rakousko), není tato zastaralá metoda využívána a vyhledávání PI zvířat jde moderní cestou přímého průkazu viru metodou PCR nebo ELISA Ag.

G. Literatura

Bachofen, C., et al. 2008. Co-existence of genetically and antigenically diverse bovine viral diarrhoea viruses in an endemic situation. *Vet. Microbiol.* 131, 93–102.

Bolin, S.R., 1988. Viral and viral protein specificity of antibodies induced in cows persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus after vaccination with cytopathic bovine viral diarrhea virus. *Am. J. Vet. Res.* 49:1040–104.

Council Directive 88/407/EHS. Směrnice rady 88/407/EHS o veterinárních požadavcích na obchod se spermatem skotu uvnitř Společenství a na jeho dovoz.

EU Thematic network on control of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) BVDV Control QLRT – 2001-01573. Position paper.

Houe, H., 1999. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVD) infections. *Vet. Microbiol.* 64: 89-107.

Houe, H., Lindberg, A., Moennig, V., 2006. Test strategies in bovine viral diarrhea virus control and eradication campaigns in Europe. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18:427–436.

Larson, R.L., et al. 2004. Bovine Viral Diarrhea (BVD): Review for Beef Cattle Veterinarians. *Bov. Pract.* 38:93-102.

Laureyns, J., et al. 2010. Control of bovine virus diarrhoea at the herd level: Reducing the risk of false negatives in the detection of persistently infected cattle. *The Veterinary Journal* 184, 21–26.

Lindberg, A. 2002. Epidemiology and Eradication of Bovine Viral Diarrhoea Virus Infections. *Doctoral thesis.*

James, A., Kennedy, J.A., et al. 2006. Reverse transcription-polymerase chain reaction on pooled samples to detect bovine viral diarrhea virus by using fresh ear-notch–sample supernatants. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18:89–93.

Lindberg, A. 2003. Bovine viral diarrhoea virus infections and its control – A review. *Veterinary Quarterly* 25 (1): 1-16.

Lindberg, A., et al. 2006. The control of bovine viral diarrhoea virus in Europe: today and in the future. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*, 25 (3), 961-979.

OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2008).

Presi, P., et al. 2010. BVD eradication in Switzerland - A new approach. *Vet. Microbiol.* 142, 137–142.

Rossmanith, W, et al. 2005. Control of BVDV-infection on common grassland – The key for successful BVDV-eradication in Lower Austria. *Prev. Vet. Med.* 72, 133–137.

Rossmanith, W., et al. 2010. Voluntary and compulsory eradication of bovine viral diarrhoea virus in Lower Austria. *Vet. Microbiol.*142, 143–149.

Van Campen, H. 2010.: Epidemiology and control of BVD in the U.S. *Vet. Microbiol.*142 94–98.

www.bvdv-control.org