



Státní  
veterinární  
ústav  
Jihlava

# Laboratorní diagnostika respiračního onemocnění skotu

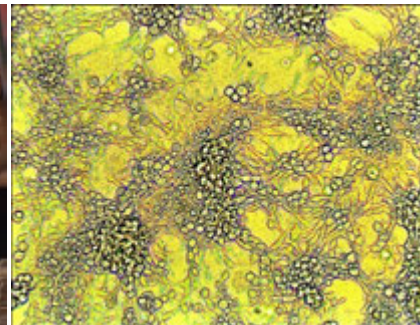
MVDr. Petr Václavek, Ph.D.

MSD Farnářské fórum, Hotel D1, Ostrovačice, 7.10.2022

# OBSAH



- 1) ODBĚR VZORKŮ pro diagnostiku ROS**
  - 2) METODY laboratorní diagnostiky ROS**
  - 3) INTERPRETACE VÝSLEDKŮ laboratorní diagnostiky**
- + ANALÝZA VÝSLEDKŮ LABORATORNÍ DIAGNOSTIKY ROS**  
**v letech 2015 - 2019**



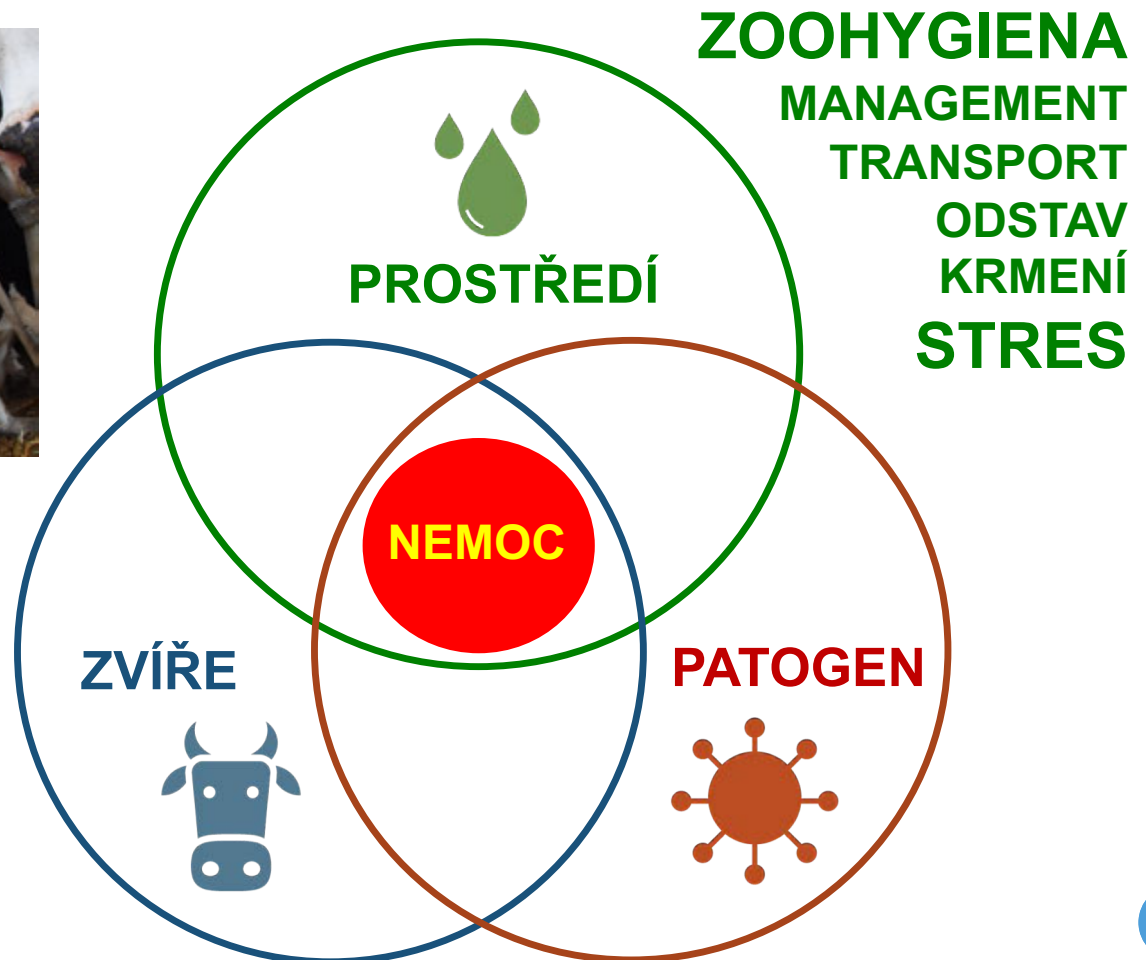
# RESPIRAČNÍ ONEMOCNĚNÍ SKOTU



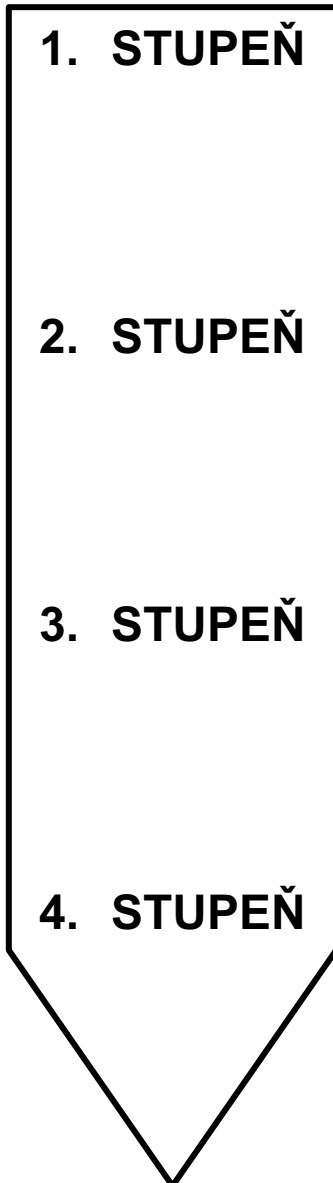
„RESPIRAČNÍ SYNDROM“  
KOMPLEXNÍ ONEMOCNĚNÍ s MULTIFAKTORIÁLNÍ ETIOLOGIÍ



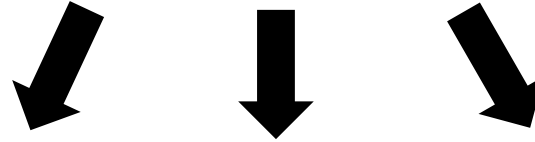
**IMUNITA ZVÍŘETE**  
IMUNOKOMPETENCE  
ZDRAVOTNÍ STAV  
VAKCINACE  
VĚK: FUNKČNÍ ZRALOST  
DÝCHACÍCH CEST A  
TERMOREGULACE



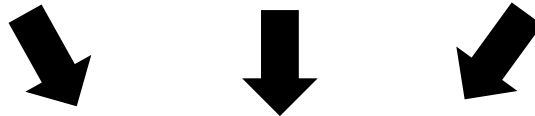
# PRŮBĚH RESPIRAČNÍHO SYNDROMU



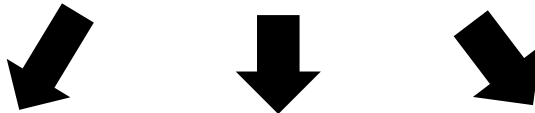
**FAKTORY PROSTŘEDÍ, STRES a IMUNITA**



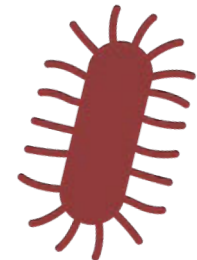
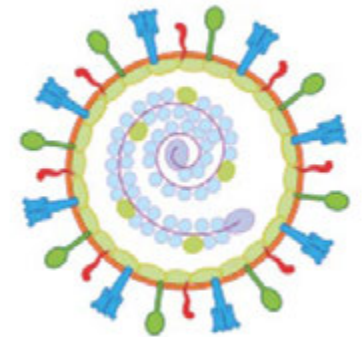
**PRIMÁRNÍ PATOGENY: VIRY**  
BRSV, PI3, adenovirus, BHV1, BVD atd.



**SEKUNDÁRNÍ PATOGENY:  
BAKTERIE A MYKOPLAZMATA**  
Mannheimia haemolytica



*P. multocida*      *H. somni*      *M. bovis*



Respirační syndrom skotu / Bovine respiratory disease (BRD)  
Enzootická pneumonie / Respirační onemocnění skotu (ROS)



## DŮLEŽITÁ FAKTA:

- ∞ nejčastěji postižena **TELATA** ve věku 2-6 MĚSÍCŮ
- ∞ více než **2/3** postižených je mladší 3 měsíců
- ∞ ALE např. BRSV i u starších zvířat
- ∞ většinou **sezónní výskyt** (podzim, zima)
- ∞ ve většině případů **SMÍŠENÁ INFEKCE** dvou a více agens
- ∞ sérové protilátky (MDA či postvakcinační) **nezaručují 100% ochranu** - difundují na sliznice plic v nízkých titrech, ve větší míře až při zánětu v exudátu
- ∞ využívá se účinné intranasální vakcinace



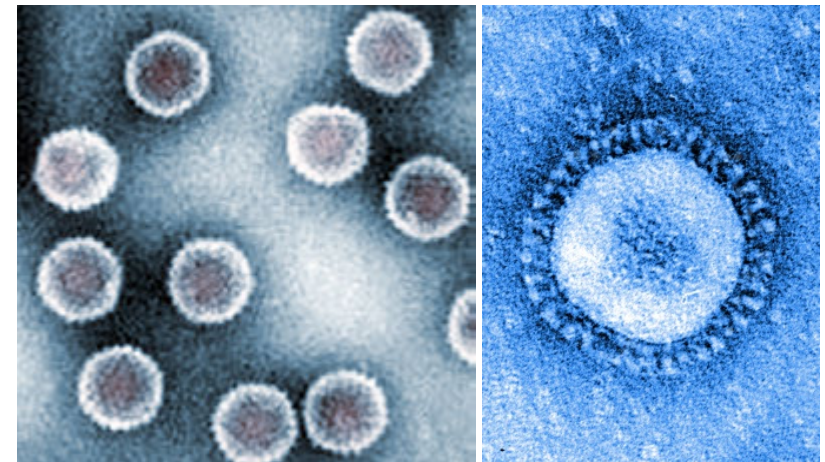
# NEJVÝZNAMNĚJŠÍ MIKROORGANISMY v etiologii respiračních nákaz skotu



## VIRY

- ∞ bovinní respirační a syncytiální virus (BRSV)
- ∞ virus parainfluenzy typu 3 (PI-3)
- ∞ virus bovinní virové diarrhoey (BVD-MD)
- ∞ bovinní herpesvirus typu 1 (BHV-1 / IBR)
- ∞ bovinní koronavirus (BoCoV)
- ∞ bovinní adenovirus
- ∞ influenza D, reovirus, rhinovirus, parvovirus

PRIMÁRNÍ



## BAKTERIE

- ∞ *Mannheimia haemolytica*
- ∞ *Pasteurella multocida*
- ∞ *Histophilus somni*
- ∞ *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma dispar*
- ∞ *Klebsiella pneumoniae*, *Trueperella pyogenes*, *Morganella morganii*, *Streptococcus spp. atd.*

SEKUNDÁRNÍ



# Laboratorní diagnostika patogenů ROS

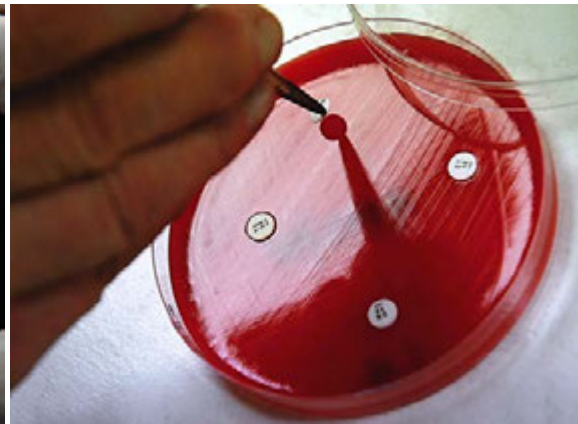
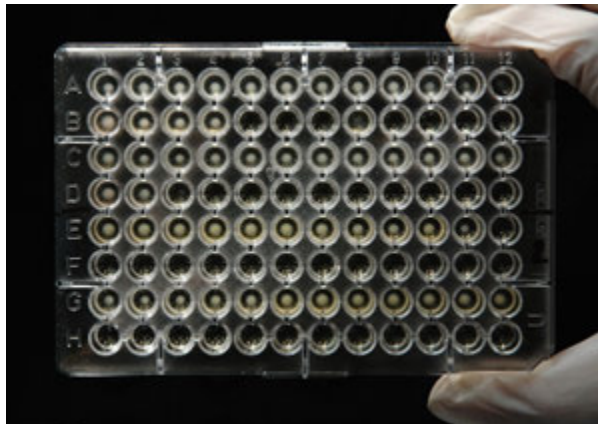
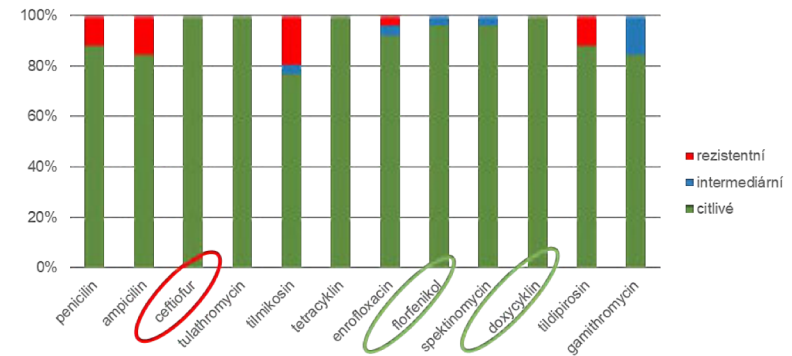


- stále velmi žádaná..

## HLAVNÍ MOTIVACE:

∞ **správná volba prevence a vakcinace**

∞ **odůvodněné a správné použití ATB** - testování citlivosti k antimikrobiálním látkám = předpoklad pro správné použití ATB při terapii



# VZORKY VHODNÉ PRO DIAGNOSTIKU



## respiračních onemocnění skotu

∞ **KREV / SÉRUM**

∞ **HLUBOKÝ NOSNÍ VÝTĚR** (nasopharyngeální výtěr)

∞ **TRANSTRACHEÁLNÍ ASPIRÁT (TTA)**

∞ **TRANSTRACHEÁLNÍ VÝPLAŠEK (TTW)**

∞ **BRONCHOALVEOLÁRNÍ LAVÁŽ (BAL)**

∞ **SEKČNÍ MATERIÁL** (plíce, trachea apod.)

∞ **STĚR Z OROPHARYNGU, SPUTUM** apod.

*TEORIE: nejvhodnější vzorky  
bez kontaminace z horních cest  
dýchacích*

**PRAXE: KVALITA VZORKŮ?  
DŮVOD VYŠETŘENÍ?  
TERAPIE?**

*většinou nevhodný vzorek z pozdní  
fáze onemocnění (bez primárních  
patogenů) a často po ATB*



# Hluboký nosní výtěr

## Transtracheální aspirát (TTA / TTW)

## Bronchoalveolární laváž (nBAL / BAL)



### LIŠÍ SE V:

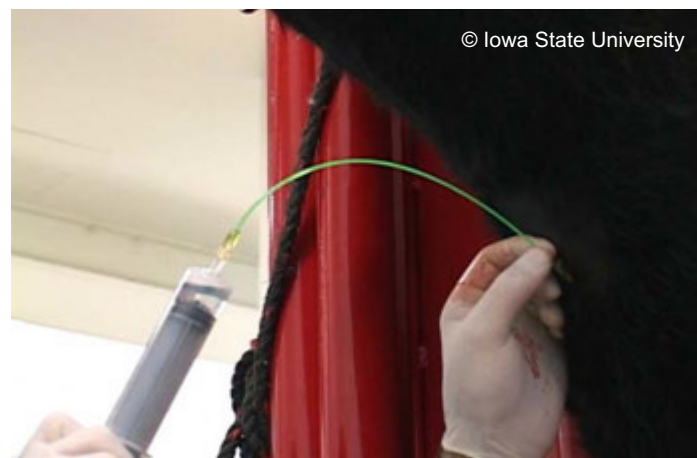
- ∞ místě vzorkování
- ∞ reprezentace dolních cest dýchacích
- ∞ potřebný materiál (jednorázový či sterilizovatelný)
- ∞ vzorkovaný povrch (0,5-10 cm<sup>2</sup>)
- ∞ cena procedury
- ∞ trvání procedury
- ∞ riziko kontaminace z nosu nebo z HCD
- ∞ složitost techniky
- ∞ možné komplikace



© B. Pardon & S. Buczinski, Vet Clin Anim 36 (2020)

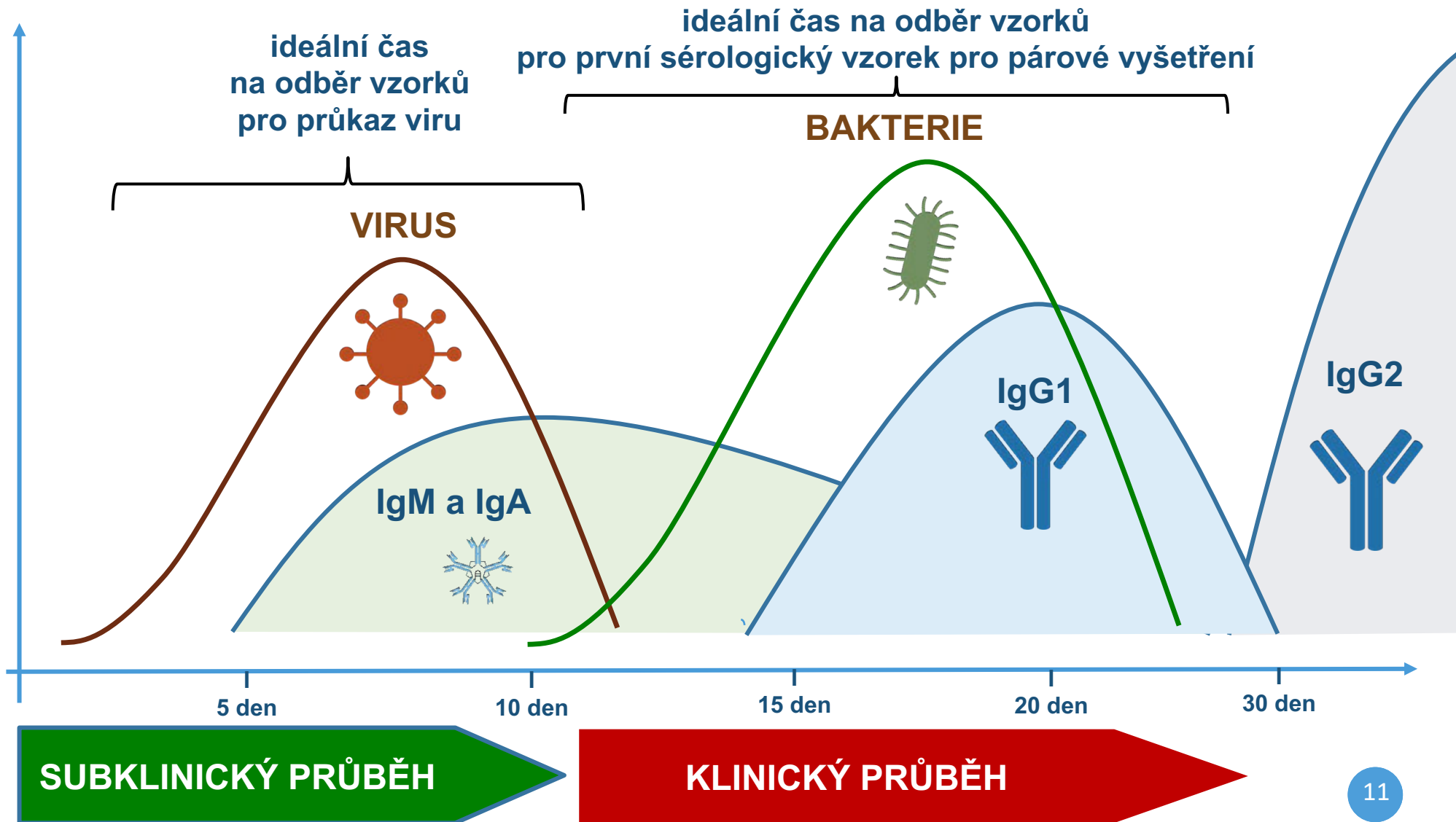
různé výhody a nevýhody – konsensus na nejlepší volbě není

# Transtracheální aspirát (TTA/ TTW)

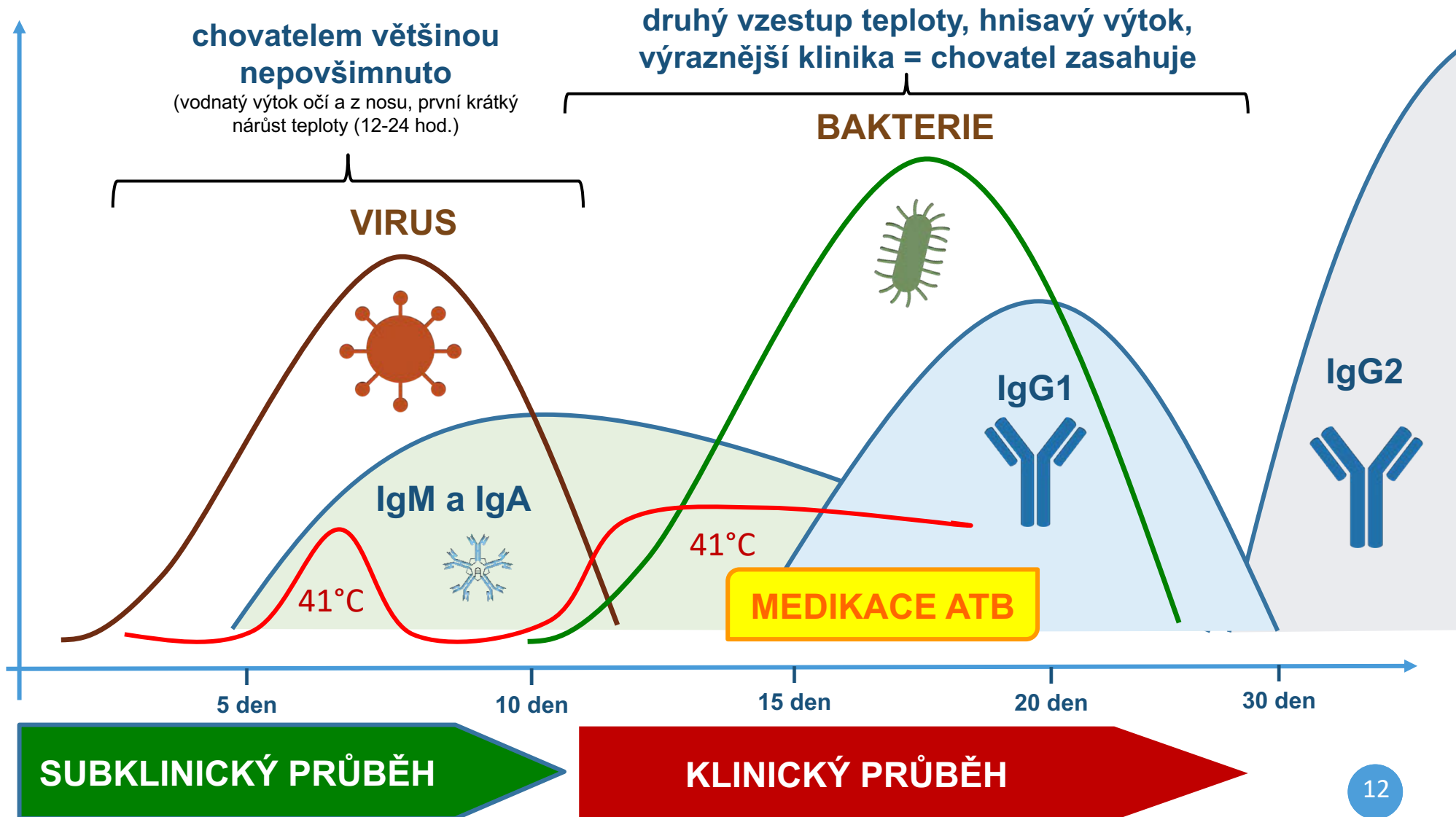


Obecně je ideální odběr zvířat v prvních dnech onemocnění, která nebyla předtím léčena ATB a nevykazují závažné respirační příznaky.

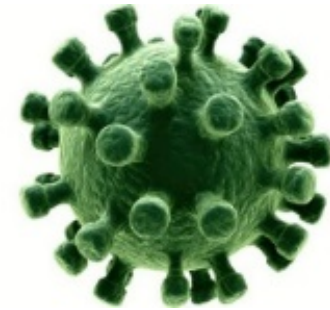
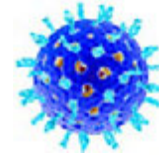
# PRŮBĚH RESPIRAČNÍHO ONEMOCNĚNÍ vs. odběr vzorků pro diagnostiku



# PRŮBĚH RESPIRAČNÍHO ONEMOCNĚNÍ vs. odběr vzorků pro diagnostiku



# OBEČNÉ ZÁSADY ODBĚRU VZORKŮ pro virologické vyšetření

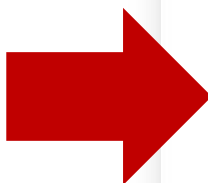


- ✓ **znalost patogeneze** virových onemocnění
- ✓ **množství viru je nejvyšší v počátečním stadiu choroby** a v místě patologických změn či na jejich periferii
- ✓ **maximální výše titru viru koreluje s vrcholem horečky** a předchází výskytu klinických změn
- ✓ různé viry – **různě dlouhá virémie, různá tenacita (°C)**
- ✓ vzorky **z pozdního stádia choroby** - menší pravděpodobnost záchytu viru
- ✓ **důležitá je komunikace: konzultace s laboratoří - ODBĚR, ODBĚROVÝ MATERIÁL, TRANSPORT a UCHOVÁNÍ** apod.





# Doporučený odběr, uložení a transport vzorků viz



STÁTNÍ VETERINÁRNÍ ÚSTAV JIHLAVA

RESPIRAČNÍ ONEMOCNĚNÍ SKOTU  
ODBĚR VZORKŮ, ULOŽENÍ, TRANSPORT, VYŠETŘENÍ



Biologický materiál k vyšetření:

1. nosní výtěr
2. výplasek (aspirát) dolních cest dýchacích (TTA, BAL)
3. sekční materiál
4. stěr z oropharyngu
5. sputum
6. krev/sérum
7. krev pro hemokulturu
8. odběr vzorků pro detekci *Mycoplasma bovis* a *Mycoplasma* sp.

STÁTNÍ VETERINÁRNÍ ÚSTAV JIHLAVA  
Raetiřovská 93, 586 05 Jihlava  
Tel: +420 567 343 297, Fax: +420 567 343 282, web: www.svjihlava.cz, E-mail: vst@svjihlava.cz



<https://www.msdfarmarskeforum.cz/diagnosticky-pruvodce/>

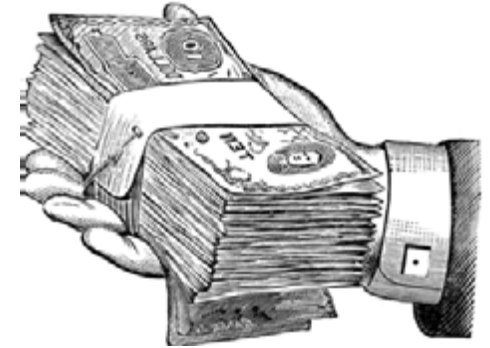
<https://www.svjihlava.cz/doprava-a-prijem-vzorku/doporučeny-odber-vzorku>

# STRATEGIE VZORKOVÁNÍ



## Návratnost vaší investice do laboratorní analýzy záleží na:

- ∞ výběru vhodných zvířat k odběru
- ∞ na technických dovednostech veterináře s odběrem vzorků
- ∞ množství vzorků
- ∞ možnosti směsování vzorků
- ∞ správné interpretaci výsledků
- ∞ rozhodnutí, učiněné na základě testů jednotlivých zvířat, ale aplikované na celou skupinu / stádo



# Analýza výsledků laboratorní diagnostiky respiračních onemocnění skotu (2015 – 2019)



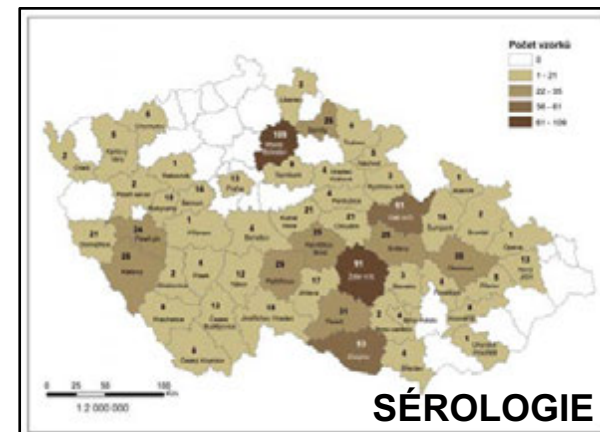
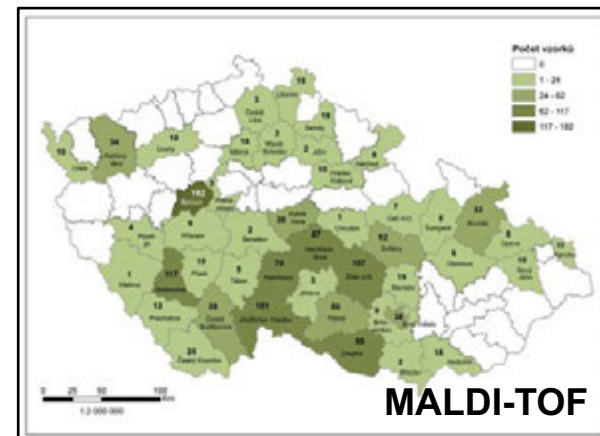
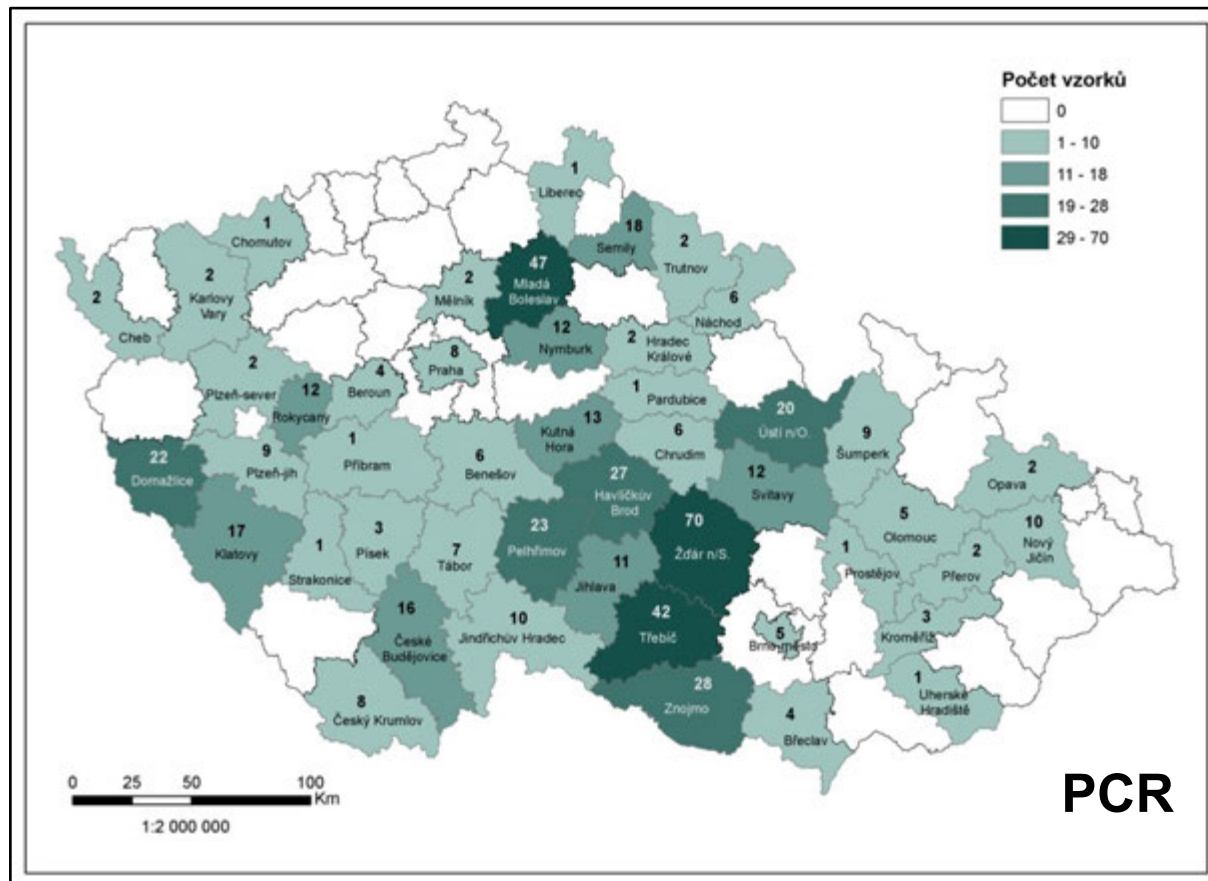
V letech 2015 - 2019 bylo v SVÚ Jihlava za účelem diagnostiky ROS vyšetřeno:

- ∞ 1317 vzorků sérologickými metodami
- ∞ 516 vzorků metodami molekulární biologie
- ∞ 844 vzorků bakteriologickými metodami





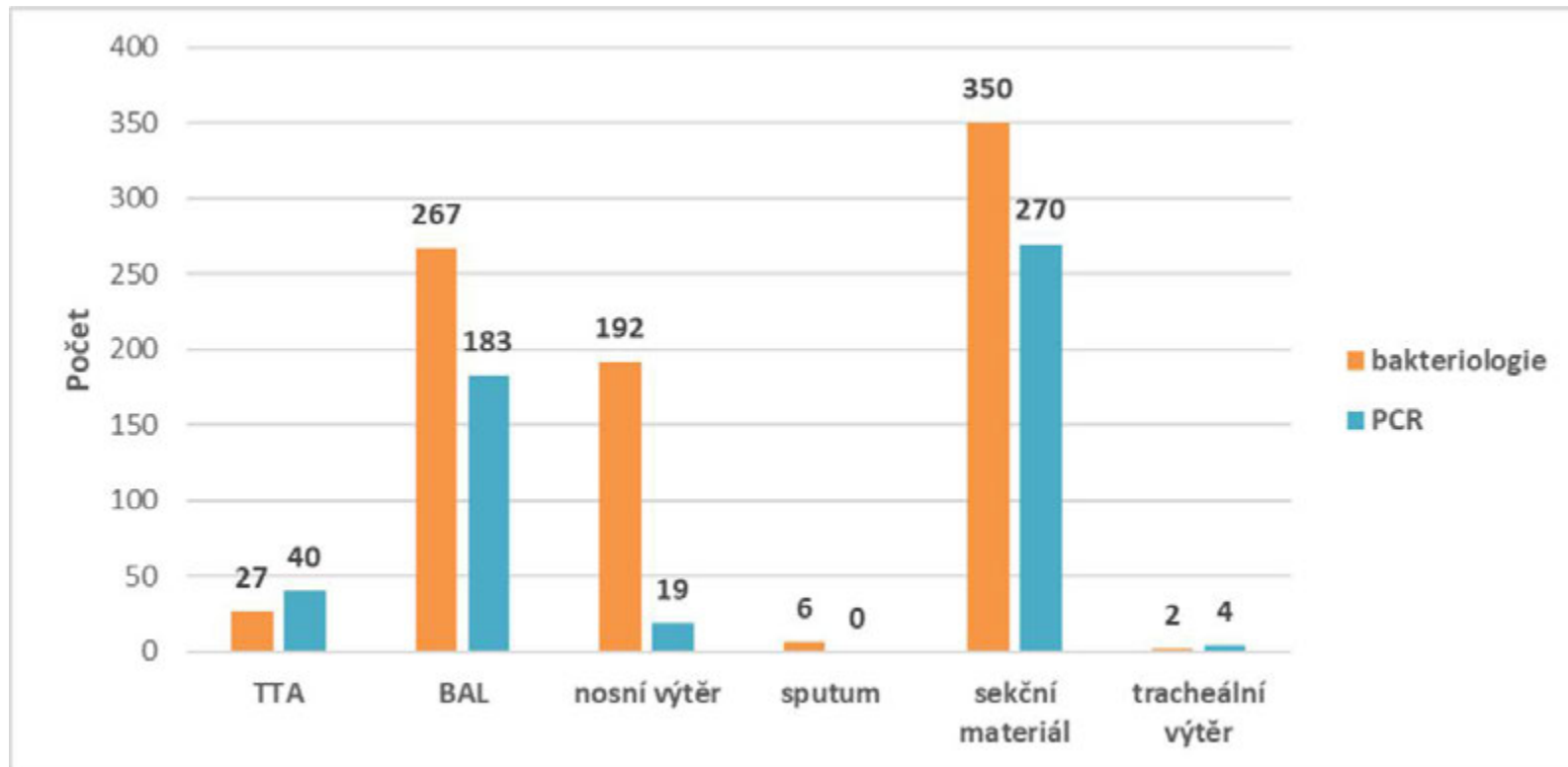
# Analýza výsledků laboratorní diagnostiky respiračních onemocnění skotu (2015 - 2019)



Počet vzorků pocházejících z jednotlivých okresů, vyšetřovaných v SVÚ Jihlava na přítomnost infekčních původců ROS v letech 2015 až 2019.

# ZASTOUPENÍ VZORKŮ pro diagnostiku resp. onemocnění skotu

SVÚ Jihlava 2015 - 2019



Počet jednotlivých druhů vzorků odebraný pro bakteriologické a molekulárně-biologické (PCR) vyšetření.

# LABORATORNÍ METODY v diagnostice ROS



∞ **SÉROLOGIE** (průkaz protilátek)

∞ **PCR**

∞ **MIKROBIÁLNÍ KULTIVACE A IZOLACE**

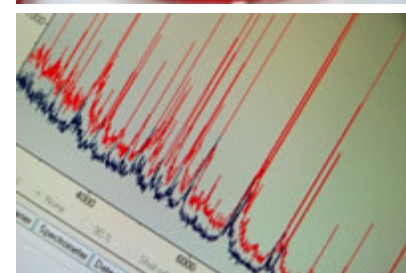
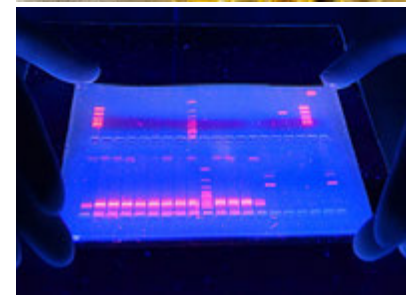
∞ **MALDI-TOF**

∞ **NGS** (sekvenování nové generace)

∞ + další méně časté: ELISA Ag, izolace viru, FA apod.

Liší se v:

- možnosti využití (co detekují)
- délka testu
- cena
- možnosti směsování
- vlastnosti (Se, Sp, kvantitativní, apod.)
- různé výhody a nevýhody



# SÉROLOGIE: detekce specifických protilátek



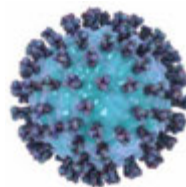
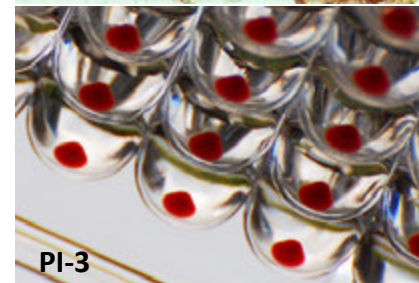
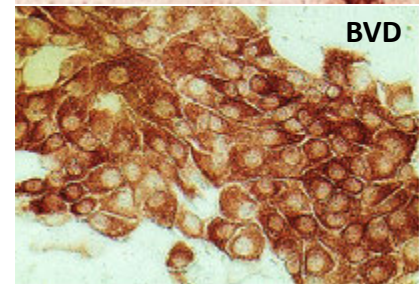
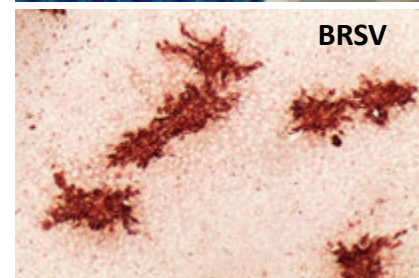
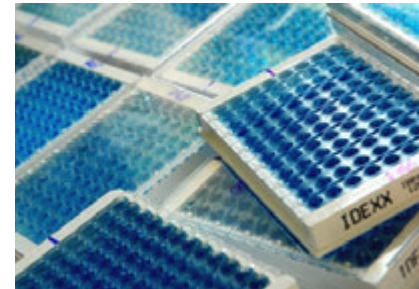
## ∞ ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

- většinou pouze kvalitativní jednoduchý výsledek = pozit. /negat.
- **vysoce senzitivní a specifický a rychlý** diagnostický test
- detekujeme: **BRSV, PI-3, BVD, IBR, BoCoV, Adenovirus, Mannheimia haemolytica, Mycoplasma bovis**

výjimky – sérologický  
průkaz bakterie

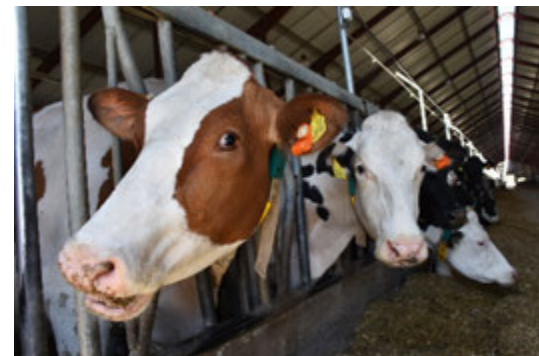
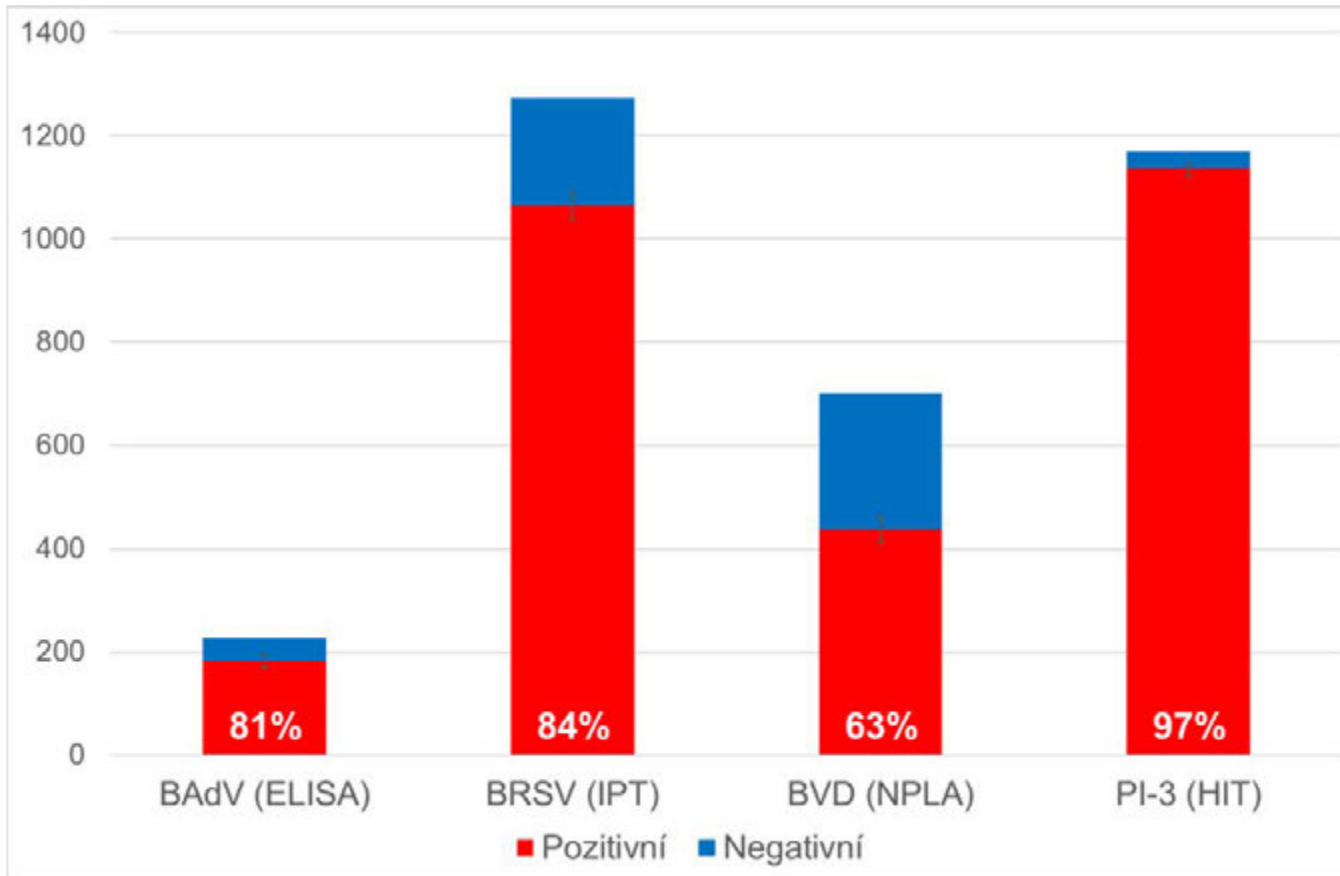
## KVANTITATIVNÍ TESTY = VÝSLEDEK JE UDÁVÁN V TITRECH

- ∞ **IPMA (imunoperoxidázový test)** – např. **BRSV**
- ∞ **VNT (virus neutralizační test)** – např. **BHV1 (IBR)**
- ∞ **NPLA (neutralizační imunoperoxidázový test)** – **BVD**
- ∞ **HIT (hemaglutinačně-inhibiční test)** – např. **PI-3**



# SÉROLOGIE:

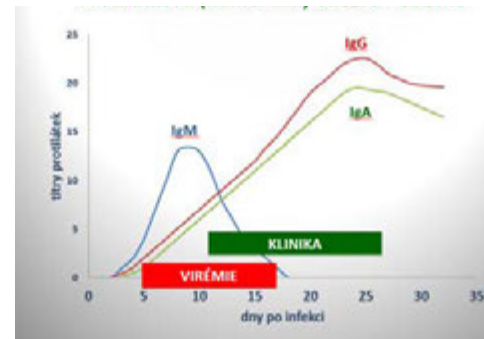
## Vyšetření ROS v SVÚ Jihlava 2015 - 2019



Relativní četnost přítomnosti specifických protilátek proti virovým původcům ROS ve vzorcích krve detekovaných v SVÚ Jihlava v letech 2015-2019 sérologickými metodami (celkem 1317 vzorků).

# LIMITY SÉROLOGIE

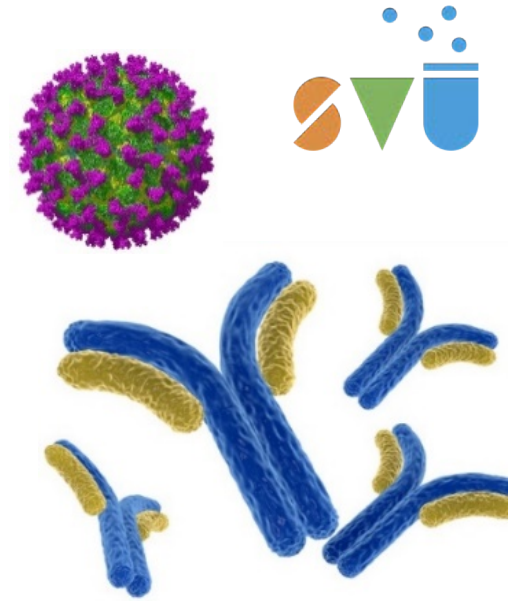
= nepřímý průkaz



- ∞ **stanovujeme imunitní odpověď na infekci** - vzestup protilátek může trvat týdny
- ∞ **stanovujeme většinou pouze IgG odpověď** (ALE nestanovujeme IgA, IgM, buněčnou imunitu, slizniční imunitu nebo nespecifické imunitní mechanismy)
- ∞ **k interpretaci jsou většinou nutné párové vzorky** (= 3 týdny)
- ∞ **nerozlišuje mateřské protilátky (MDA) a postinfekční protilátky**
- ∞ **nerozlišuje postvakcinační a postinfekční protilátky** (výjimka IBR gE)
- ∞ **výběr vzorkovaných zvířat je kritickým bodem**
- ∞ **nevhodně odebrané vzorky (načasování) = interpretace výsledků?**

# VHODNÉ VYUŽITÍ SÉROLOGIE

- ∞ monitoring nákaz
- ∞ cílení vakcinačních programů
- ∞ určení protektivního statusu (ALE – protektivní titr?)
- ∞ k vyhodnocení dynamiky infekce ve stádě
- ∞ určení statusu stáda po ozdravování (IBR,BVD,...)



# PÁROVÉ VZORKY: sledování dynamiky titrů protilátek



BOVINNÍ RESPIRATORNÍ SYNCYTIÁLNÍ VIRUS ( BRSV ) Průkaz protilátek proti BRSV testem IPMA IMUNOPEROXIDÁZOVÝ TEST	
Titř protilátek	Vz. č.
negativní (<1:20)	5
1:20	8
1:40	3, 4, 9, 10
1:80	-
1:160	2, 6
1:320	7
1:640	1
1:1280	-
≥ 1:2560	-
Nehodnotitelné	-
Málo séra – netestováno	-
Celkem testováno vz.	10

3 - 4 TÝDNY

BOVINNÍ RESPIRATORNÍ SYNCYTIÁLNÍ VIRUS ( BRSV ) Průkaz protilátek proti BRSV testem IPMA IMUNOPEROXIDÁZOVÝ TEST	
Titř protilátek	Vz. č.
negativní (<1:20)	-
1:20	-
1:40	-
1:80	-
1:160	-
1:320	9
1:640	4, 5
1:1280	3, 6, 7
≥ 1:2560	1, 2, 8, 10
Nehodnotitelné	-
Málo séra – netestováno	-
Celkem testováno vz.	10





# PCR SCREENING původců respiračních onemocnění skotu

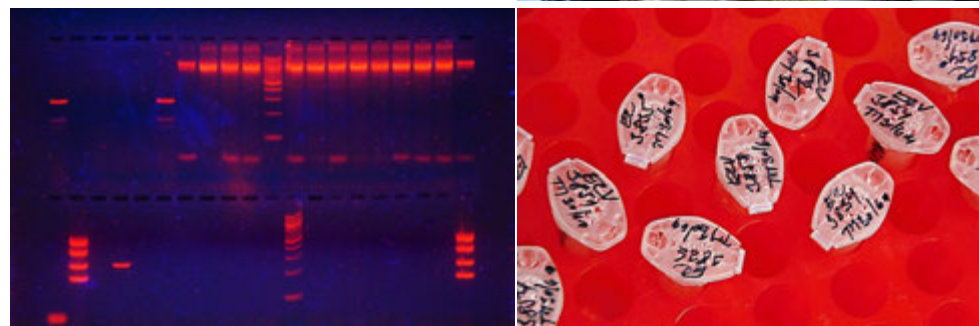
- 1 odběr/vzorek (TTA, BAL, plíce, výtěr nebo sputum) – 7 patogenů
- detekce genomu/NK = detekce živých i neživých mikroorganismů
- lze využít i na počátku medikace ATB
- 7 x Real time RT-PCR / PCR – „balíček“ vyšetření

## VIRY

- ∞ boviní respirační a syncytiální virus (BRSV)
- ∞ virus parainfluenzy typu 3 (PI-3)
- ∞ boviní koronavirus (BoCoV)

## BAKTERIE

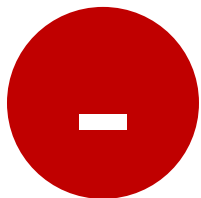
- ∞ *Mannheimia haemolytica*
- ∞ *Pasteurella multocida*
- ∞ *Histophilus somni*
- ∞ *Mycoplasma bovis*



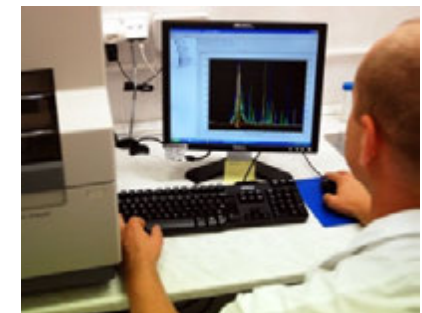
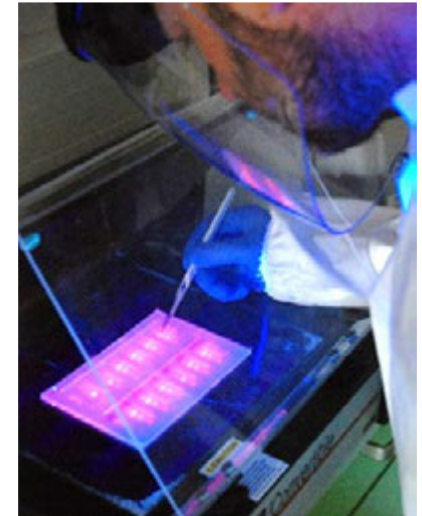
# VÝHODY A NEVÝHODY PCR



- ∞ velmi vysoká senzitivita
- ∞ nepotřebujeme živé mikroorganismy
- ∞ možné směsování vzorků
- ∞ možný kvantitativní výsledek (qPCR)
- ∞ lze použít na detekci všech virů i bakterií
- ∞ možná sekvenace + detekce genů rezistence

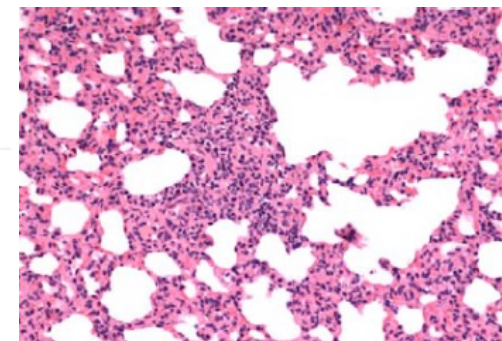
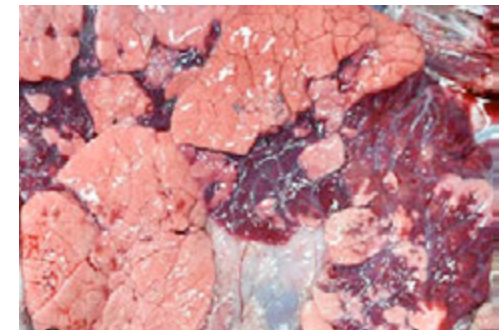
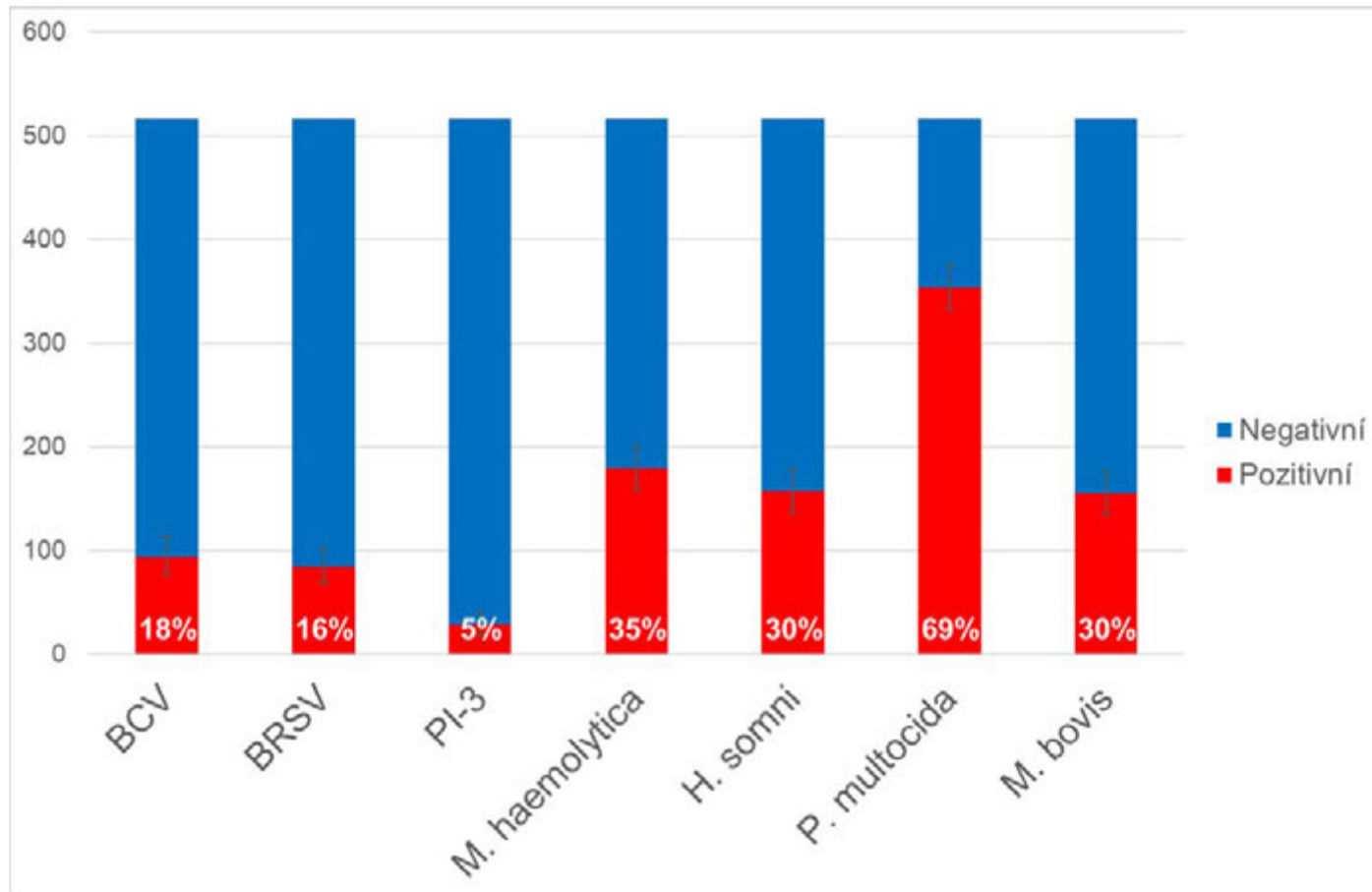


- ∞ velmi vysoká senzitivita
- ∞ možná detekce vakcinačního kmene (MLV)
- ∞ hledáme konkrétní patogen = falešně negativní ?
- ∞ vyšší cena



# PCR:

## Vyšetření ROS v SVÚ Jihlava 2015 - 2019

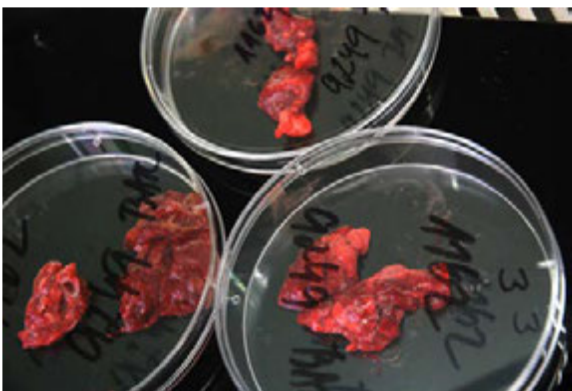


Relativní četnost virových a bakteriálních původců ROS detekovaných molekulárně-biologickými metodami (real-time PCR, real-time RT-PCR) v letech 2015-2019 v SVÚ Jihlava ve vzorcích sekčního materiálu, TTA a BAL.

# METODY PŘÍMÉHO PRŮKAZU BAKTERIÁLNÍCH PŮVODCŮ ROS



## KULTIVACE A IZOLACE



# Rodová a druhová identifikace mikroorganismů



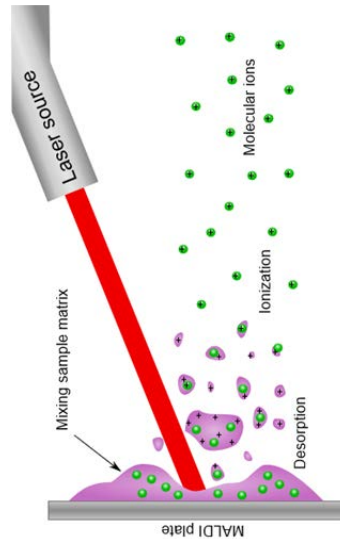
## hmotnostní spektrometrií

# MALDI-TOF MS

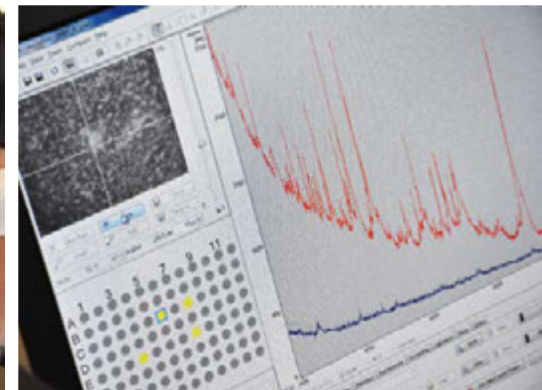
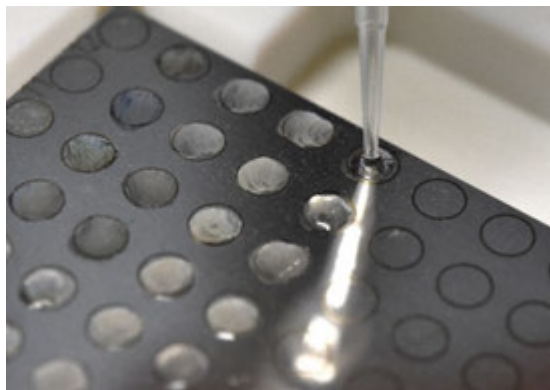
*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*

*s analyzátorem doby letu*

*Time of Flight Mass Spectrometry*

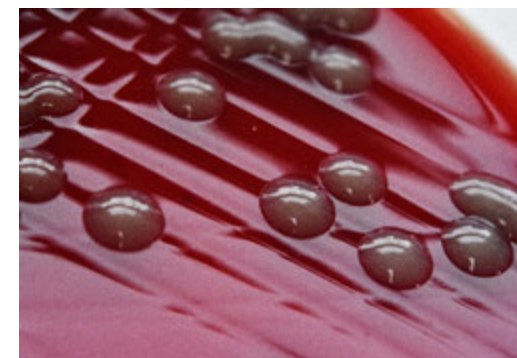
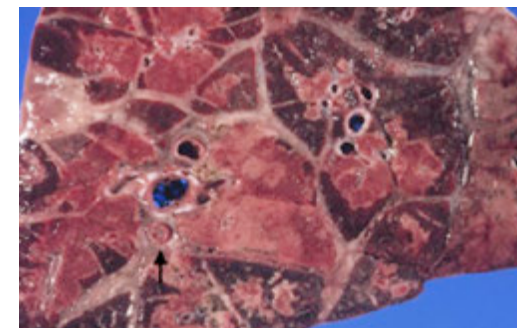
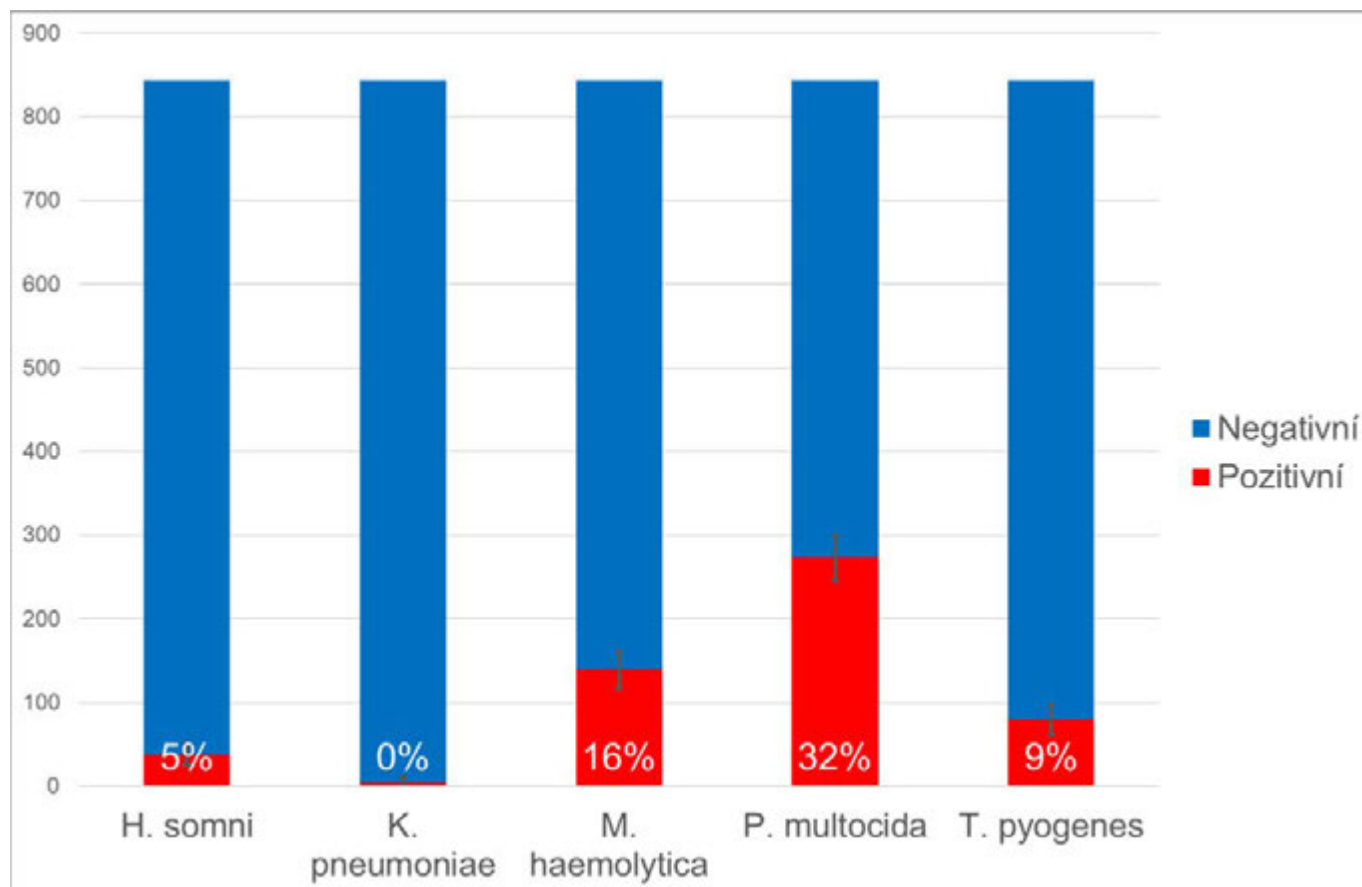


rychlá a přesná identifikace izolovaných bakterií, plísní a kvasinek  
podle jejich jedinečných proteinových profilů



# BAKTERIOLOGIE:

## Vyšetření ROS v SVÚ Jihlava 2015 - 2019



Relativní četnost bakteriálních původců ROS detekovaných bakteriologickými metodami (kultivace, MALDI-TOF) v letech 2015-2019 v SVÚ Jihlava.





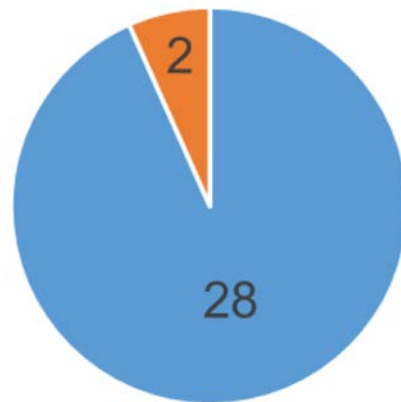


# BAKTERIOLOGIE vs. PCR:

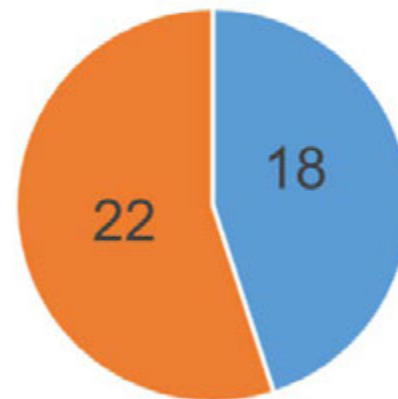
Vyšetření ROS v SVÚ Jihlava 2015 - 2019



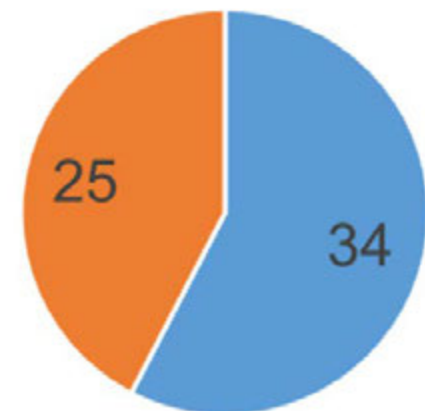
Histophilus somni



Mannheimia haemolytica



Pasteurella multocida



■ Pozitivní PCR

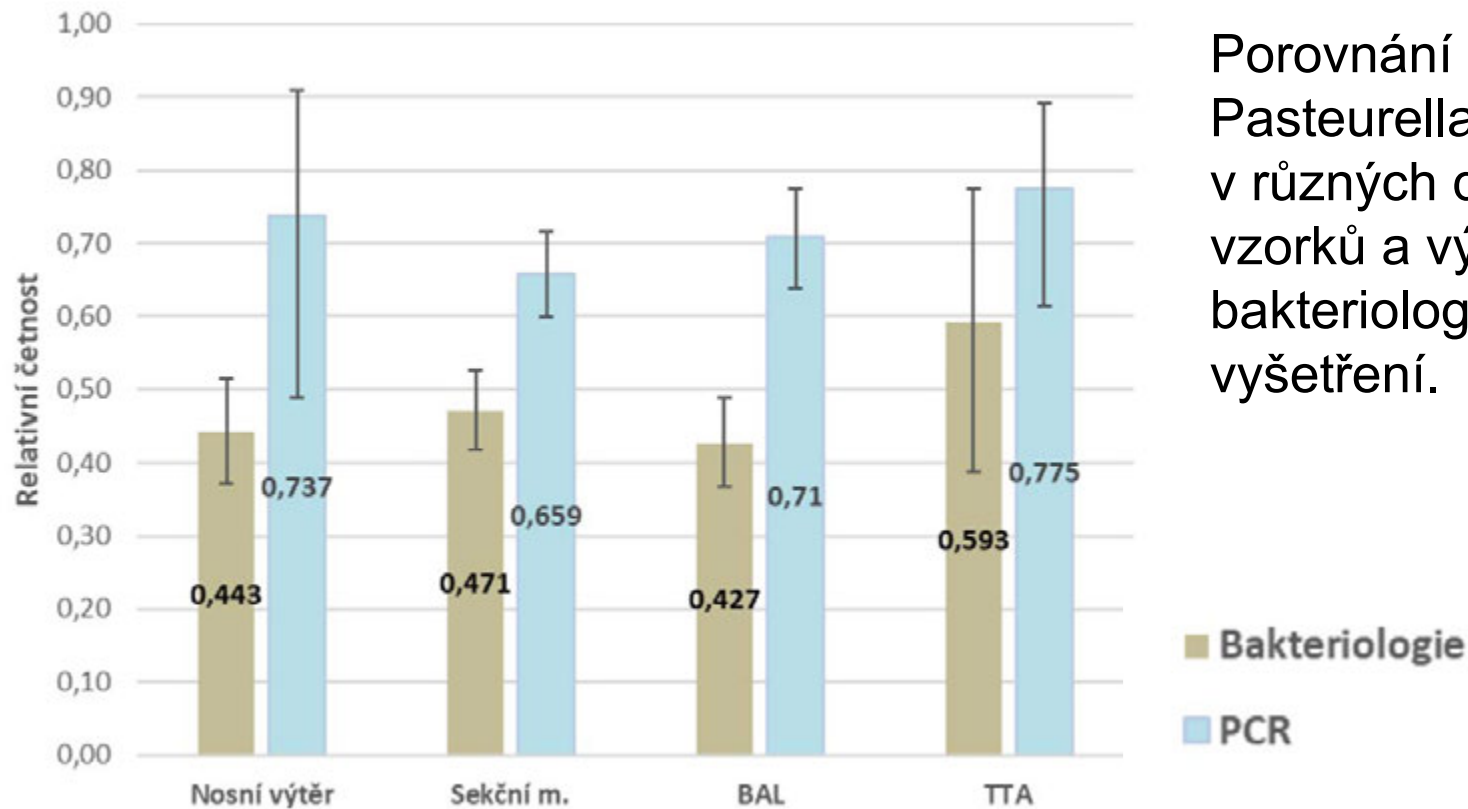
■ Pozitivní PCR + izolace/kultivace

**Porovnání molekulárně-biologického (real-time PCR) a bakteriologického průkazu (kultivace, izolace, MALDI-TOF) původců ROS ve vyšetřovaných vzorcích pocházejících z vybraného chovu (n = 79).**

Kvalita odběru BAL/TTA? Důvod odběru? Čas odběru (klinická fáze)?



# Porovnání záchytu z různých typů vzorků



Porovnání četnosti průkazu *Pasteurella multocida* v různých druzích odebraných vzorků a výsledků bakteriologického a PCR vyšetření.

Průkaz patogenů ROS byl výrazně vyšší při využití metody PCR

# NGS (sekvenování nové generace)



- ∞ umožňuje **efektivní „čtení“ velkého množství genetických sekvencí** (úseků DNA) najednou
- ∞ **zpracovávají tisíce až miliony sekvencí současně = obrovské množství výstupních dat**
- ∞ metoda s velkým potenciálem dalšího rozvoje a širokého uplatnění u všech typů genetických vyšetření (cílených sekvencí/genů i celého genomu)
- ∞ **všechny možné patogeny současně detekované a kvantifikované**
- ∞ je možná typizace kmenů i genů rezistence

**Limitujícími faktory:** časové a finanční náklady, vzdělání (schopnosti správně interpretovat výsledky), ALE to je překonatelné = v nejbližší době se NGS / WGS a metagenomika stanou běžnou metodou v klinických laboratořích.





# INTERPRETACE výsledků laboratorních testů

**K určení příčiny (kauzality) ROS vyžadujeme informace o:**

- ∞ identifikovaném patogenu (subtyp, rezistence, virulence apod.)
- ∞ místě dýchacího traktu, kde se odebral vzorek
- ∞ použitém diagnostickém testu
- ∞ klinickém stavu zvířete (+ věk, MDA apod.)
- ∞ zda vzorek pochází z jednoho zvířete nebo je směsný
- ∞ o použité vakcinaci či ATB

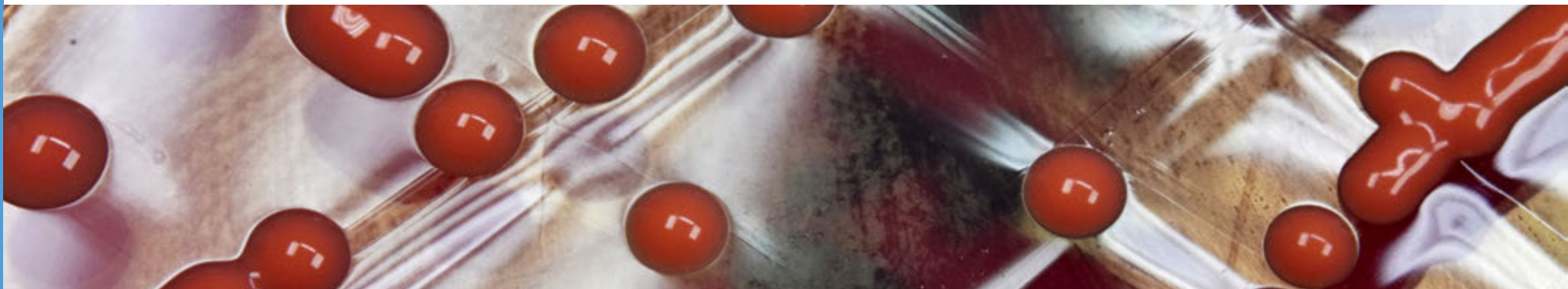
+ je nutné počítat s nedostatky a s mezerami ve výzkumu a s absencí univerzální „gold standard“ kombinace (vzorek + test + interpretace)



# Závěrem k výsledkům analýzy ROS 2015 – 2019 SVÚ Jihlava



- ∞ nejvyšší zastoupení ve všech typech vzorků - *P. multocida* bakteriologickými i PCR metodami (následuje *M. haemolytica* a *M. bovis*)
- ∞ přímý průkaz bakteriálních původců ROS relativně častý (30-69 %)
- ∞ nedochází k časté detekci virů metodou PCR (5-21 %)
- ∞ nejvyšší četnost virových patogenů byla detekována PCR metodami v sekčním materiálu (BCV – 15,9 %; BRSV- 21,5 %; PI-3 – 5,6 %) a v BAL
- ∞ vysoké procento zvířat s přítomností protilátek proti viru BRSV, PI-3, BAdV a BVD (63-97 %)



# Závěrem k výsledkům analýzy ROS 2015 – 2019 SVÚ Jihlava



- ∞ **pravděpodobně v mnoha případech nevhodný odběr vzorků až po aplikaci ATB = zkreslení výsledků a komplikovaná interpretace**
- ∞ **k odběru párových vzorků krve dochází často pozdě - v obou odběrech jsou detekovány vysoké titry bez signifikantního rozdílu**
- ∞ **výběr vzorkovaných zvířat je kritickým bodem (pro sérologické vyšetření i pro přímý průkaz)**
- ∞ **počet vzorků musí být reprezentativní a musí reflektovat počet zvířat ve stádě či hale a také odhad prevalence onemocnění v chovu**



# Laboratorní diagnostika patogenů ROS



Přes různé možnosti vzorkování a přes pestrou nabídku laboratorních testů je zde ještě **mnoho výzev**:

- ∞ rychlost vývoje nové laboratorní diagnostiky předčila schopnosti lékařů správně interpretovat výsledky testů
- ∞ stále existují pochybnosti o klinickém významu některých detekovaných oportunních patogenů
- ∞ stále jsou pochybnosti, jak interpretovat výsledky laboratorních testů v závislosti na tom, jaký vzorek byl testován
- ∞ interpretace antibiogramů + individuální vs. plošná medikace (bez důkazu o nutnosti bude stále více kritizována)

# ZÁVĚR



Spolehlivá a včasná laboratorní diagnostika nezbytná pro správnou volbu **terapie, prevence a profylaxe.**

Výsledek laboratorní diagnostiky respiračních onemocnění skotu

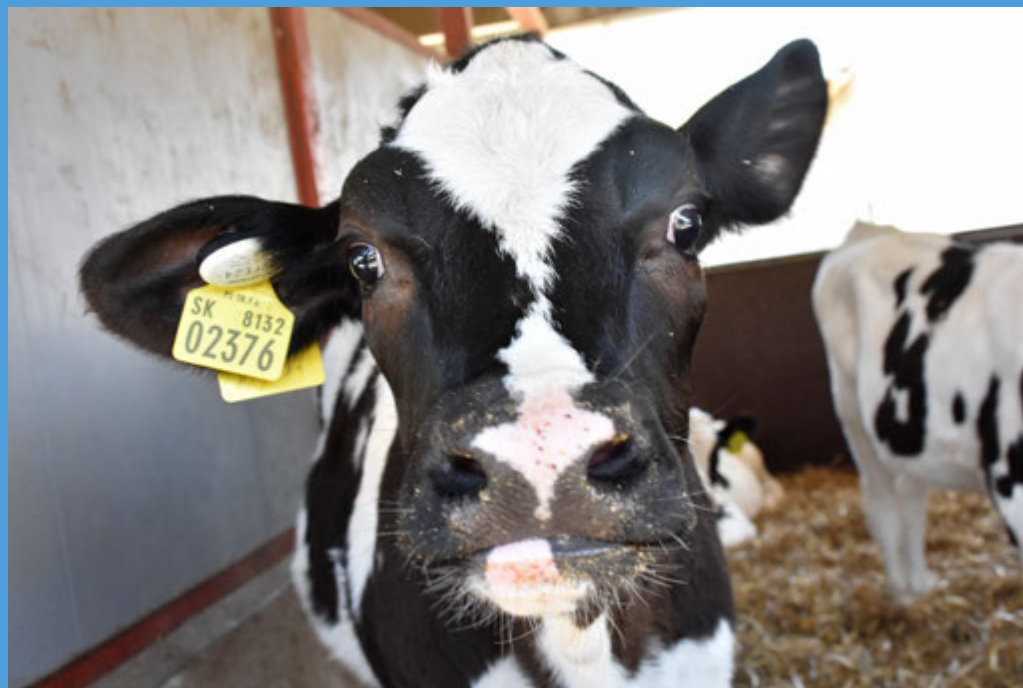
je ovlivněn mnoha faktory:

- ∞ správným odběrem vzorku
- ∞ vhodné uskladnění a transport vzorku
- ∞ správná volba testu
- ∞ správná interpretace laboratorních výsledků





# Děkuji za pozornost



**Státní veterinární ústav Jihlava**  
**State Veterinary Institute Jihlava**

Rantířovská 93/20 | 586 05 Jihlava | ČR

T: 567 143 111 | E: [info@svujihlava.cz](mailto:info@svujihlava.cz) | [www.svujihlava.cz](http://www.svujihlava.cz)