

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2019

Lenka Hubáčková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Lawsonia intracellularis

Lenka Hubáčková

Bakalářská práce

2019

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Lenka Hubáčková**
Osobní číslo: **C15409**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Lawsonia intracellularis**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracujte literární rešerši na dané téma.
2. V rešerši se zaměřte na obecnou charakteristiku a zařazení této bakterie, výskyt, patogenizi a diagnostiku.
3. Popište onemocnění způsobené touto bakterií, léčbu a prevenci.
4. Uveďte nejnovější výskyty onemocnění způsobené bakterií druhu *Lawsonia intracellularis* v ČR a ve světě.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Iveta Brožková, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd


Datum zadání bakalářské práce: **27. listopadu 2017**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně s využitím literárních pramenů a informací, které jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47 b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 25. 06. 2019

Lenka Hubáčková

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala Ing. Ivetě Brožkové, Ph.D. za vstřícnost, cenné rady a odborné připomínky při konzultacích a vypracování bakalářské práce.

Veliké díky patří mé rodině, přátelům a mému příteli za podporu po celou dobu mého, ne vždy lehkého studia.

ANOTACE

Lawsonia intracellularis je obligátně intracelulární bakterie způsobující proliferativní enteropatie u celé škály zvířat. Nejvíce postihuje prasata a koně. Proliferativní enteropatie je endemické onemocnění s vysokou prevalencí po celém světě.

KLÍČOVÁ SLOVA

Lawsonia intracellularis, patogeneze, diagnostika, proliferativní enteropatie, PE, porcinní proliferativní enteropatie, PPE, proliferativní enteropatie koní, EPE

TITLE

Lawsonia intracellularis

ANNOTATION

Lawsonia intracellularis is a obligatory intracellular bacterium causing proliferative enteropathy across a range of animals. Most affected by pigs and horses. Proliferative enteropathy is an endemic disease with high prevalence worldwide.

KEYWORDS

Lawsonia intracellularis, pathogenesis, diagnosis, proliferative enteropathy, PE, porcine proliferative enteropathy, PPE, equine proliferative enteropathy, EPE

OBSAH

Úvod.....	12
1 CHARAKTERISTIKA	13
1.1 Taxonomické zařazení	13
1.2 Morfologie a buněčná struktura	14
1.3 Výskyt	14
1.4 Patogeneze.....	15
1.4.1 Osídlování střevní sliznice.....	15
1.4.2 Připojení k hostitelské buňce	15
1.4.3 Vstup bakterie do hostitelské buňky	16
1.4.4 Únik z intracelulární vakuoly	17
1.4.5 Intracelulární rozmnožování a kolonizace střevního epitelu	17
1.4.6 Proliferace buněk	18
1.4.7 Imunitní odpověď	19
1.4.8 Bakteriální perzistence uvnitř buněk	19
1.4.9 Jiné aspekty patogenese.....	20
1.5 Diagnostika	20
2 Porcinní proliferativní enteropatie	24
2.1 Epizootologie	26
2.2 Prevalence	27
2.3 Patogeneze.....	27
2.4 Klinické příznaky	27
2.4.1 Chronická forma (PIA).....	28
2.4.2 Akutní forma (PHE).....	29
2.4.3 Diferenciální diagnóza.....	30
2.5 Léčba.....	31

2.6	Prevence a monitoring.....	33
2.6.1	Prevence zavlečení infekce do chovu	34
2.6.2	Redukce šíření infekce v chovu	34
2.6.3	Eradikace infekce z chovu	34
2.7	Ekonomické dopady Ileitidy	36
3	Proliferativní enteropatie koní	36
3.1	Etiologie	37
3.2	Epizootologie	37
3.3	Patogeneze.....	38
3.4	Klinické příznaky	38
3.5	Diagnostika	41
3.6	Léčba	42
3.7	Monitoring a prevence	43
4	ZÁVĚR	45
5	Použitá literatura	46

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1-Disbióza pozorovatelná u infekce <i>L.intracellularis</i>	16
Obrázek 2- Ileum- Warthin-Starry barvení ukazující intracelulární bakterie	22
Obrázek 3- Formy Porcinní proliferativní enteropatie	25
Obrázek 4-Elektronová mikroskopie <i>Lawsonia intracellularis</i> v čistých kulturách.	41
Tabulka 1-Srovnání patogeneze infekce <i>L.intracellularis</i> s ostatními intracelulárními bakteriálními infekcemi	20

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ADG	Průměrný denní hmotnostní přírůstek
ELOSA	Enzymově vázané oligosorbentní stanovení
EPE	Proliferativní enteropatie koní
FITC	Fluorescein isothyokyanát
FCE	Účinnost konverze krmiva
IFAT	Immunofluorescence antibody test- Test nepřímé fluorescence
IgA	Imunoglobulin A
IgG	Imunoglobulin G
IgM	Imunoglobulin M
IPMA	Immunoperoxidase monolayer test- Imunoperoxidázový monolayerový test
<i>L. intracellularis</i>	<i>Lawsonia intracellularis</i>
NE	Nekrotická enteritida
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PE	Proliferativní enteropatie
PHE	Porcinní hemorhagická enteritida
PIA	Porcinní intestinální adenomatóza
RI	Regionální ileitida

ÚVOD

Po mnoho let zůstávala identita etiologického původce proliferativní enteropatie zvířat nejasná. Nově klasifikovaná intracelulární bakterie, *Lawsonia intracellularis* byla nedávno potvrzena jako příčina tohoto onemocnění. Onemocnění způsobené *L.intracellularis* vždy vykazovalo nezvyklý proces reprodukce a neobvyklé patologické znaky. Proliferativní enteropatie je běžné střevní onemocnění postihující vnímavá zvířata, nejčastěji prasata po celém světě.

Proliferativní onemocnění střev prasat bylo poprvé popsáno jako případová zpráva v roce 1931. Čtyřicet nebo více let uběhlo, než došlo k potvrzení přítomnosti intracelulárních bakterií v proliferativních lézích. Navzdory extrémním potížím izolovat obligátně intracelulární bakterii *L. intracellularis* se v této době novými technikami kultivace v buněčných kulturách přispělo k lepší charakterizaci a pochopení.

Lawsonia intracellularis je gram-negativní bakterie nacházející se v apikální části cytoplasmu střevních buněk. Životní cyklus a mechanismus napadení hostitele této bakterie je zcela odlišný od ostatních intracelulárních bakterií. Během infekce žije bakterie volně uvnitř buněčné cytoplazmy. *L. intracellularis* napadá epiteliální buňky střeva a tím způsobuje vznik hyperplazie infikovaných buněk a vede k procesu vzniku onemocnění.

Proliferativní enteropatie způsobené *L. intracellularis* zahrnují průjem, zpomalený růst a možnou smrt. Toto onemocnění bylo pojmenováno kolem roku 1993, když bylo zjištěno, že jeden jediný organismus, *Lawsonia intracellularis* je zodpovědný za všechny rozdílné klinické a patologické formy tohoto onemocnění.

Diagnostické metody, vylepšené o citlivější detekci bakterie a zaznamenání časného nástupu Proliferativní enteropatie zahrnují různé sérologické a molekulární analýzy. Histologické testy, jako je imunohistochemie, jsou nadále zlatým standardem pro potvrzení lézí specifických pro *L.intracellularis*.

Onemocnění způsobené *L.intracellularis* je z důvodu nepřiměřeného používání antimikrobiálních látek, hospodářskou ztrátou spojenou se špatným růstem prasnic ve výkrmu, mortalitu při hemorhagické formě a náklady na léčbu jedním z nejzávažnějších ekonomických problémů této doby.

1 CHARAKTERISTIKA

Lawsonia intracellularis je obligátně patogenní bakterie z rodu *Lawsonia* způsobující onemocnění zvané proliferativní enteropatie (PA). Působí onemocnění široké škály zvířat (frettek, králíků, lišek, krys, koní, opic, pštrosů, ovcí, jelenů, morčat a křečků), zejména ale prasat (McOrist *et al.*, 1995). Tento intracelulární mikroorganismus nikdy nebyl prokázán u lidí s enterálními chorobami a proto není považován za antropozoonózu (Lawson *et al.*, 1993). Infekce zahrnuje vodnaté průjmy, zakrnělý růst, úbytek hmotnosti a v mnoha případech smrt a je jednou z ekonomicky nejzávažnějších chorob chovu prasat. Specifické proliferativní léze pro PE se nachází v intestinálním traktu, nejvíce v tenkém střevě a méně běžně v tlustém střevě (Mølbak *et al.*, 2008). *L.intracellularis* je však zřetelně odlišná od ostatních intracelulárních bakterií a tím vzbuzuje obrovský zájem jak vztahem k samostatné chorobě zvířat, tak jedinečnou povahou proliferativních lézí. Ačkoli první případ onemocnění byl popsán v roce 1931, teprve v roce 1993 byla tato intracelulární bakterie izolována v buněčné kultuře z infikovaných prasat pomocí buněčné linie enterocytů potkana, byly naplněny Kochovy postuláty a tak vytvořen nový rod a druh (Gebhart *et al.*, 2010; Vannucci *et al.*, 2014). Obtížnost diagnostiky na živých prasatech vedla k rozsáhlému používání preventivních opatření antimikrobiálních léků v krmivech bez racionálního základu pro jejich použití (McOrist *et al.*, 1985). Studie o farmakologických prevalencích v mnoha zemích po celé Evropě, Asii i Americe nyní ukazují, že osmina z dotazovaných má závažný problém s tímto onemocněním. Záznamy sérologických vyšetření odhalují, že s *Lawsonií intracelularis* se setkalo více než 90 % farem po celém světě (Hardge *et al.*, 2006).

1.1 Taxonomické zařazení

Doména: *Bacteria*

Oddělení: *Proteobacteria*

Třída: *Deltaproteobacteria*

Řád: *Desulfovibrionales*

Čeleď: *Desulfovibrionaceae*

Rod: *Lawsonia*

Druh: *Lawsonia intracellularis*

Teprve nedávno popsáný mikroorganismus, intracelulární symbiont tenkého střeva nebylo od počátku lehké klasifikovat. Taxonomické studie byly prováděny pomocí purifikovaných bakterií přímo z infikovaných tkání prasat postižených tímto patogenem. Prvotní studie vycházely z domněnky, že intracelulární symbiont je nepopsáný druh rodu *Campylobacter*, později však byly popsány imunologické vlastnosti, které tomuto rodu nenáleží. Následné studie, ve kterých byla amplifikována a sekvenována 16S ribozomální DNA již vedla k informaci, že intracelulární bakterie patří k rodu *deltaProteobacteria*. Jednotlivé DNA sekvence byly nejvíce podobné sekvencím proteobakterií redukující sulfát, bakteriím *Desulfovibrio desulfuricans*. Dalšími studiemi se zjistily změny v buněčné morfologii, fenotypu a genotypu, proto bylo nutné zavést nový dříve nepopsáný druh *Lawsonia intracellularis* (McOrist *et al.*, 1995). Tento druh pro srovnávání je 1482/8 a je uložen v Národní referenční laboratoři v Londýně kódem NCTC 12656 (Gebhart *et al.*, 1993). Celý genom prasečího izolátu *L.intracellularis* PHE/MN1-00 obsahuje celkem 1 719 014 párů bází rozdělených do jednoho malého chromozomu a 3 plasmidy (Pusterla *et al.*, 2013).

1.2 Morfologie a buněčná struktura

Bakterie uvolněná z hostitelských nebo kultivovaných buněk je gram negativní bakterie s protoplasmatickou strukturou prokaryot, netvoří spóry. Má tvar sigmoidní tyče, je variabilně zakřivená a na obou koncích se zužuje. Buňky jsou dlouhé od 1,25 μ m do 1,75 μ m a široké 0,5-1,5 μ m. Bakteriální stěna obsahuje trilaminární vnější obal, který se často odděluje od cytoplasmatické membrány pomocí zóny s elektrony (Collins *et al.*, 2001). Bakterie nejsou pigmentované. Nemají flagella, pilli ani fimbrie, tudíž nemají schopnost se pohybovat (McOrist *et al.*, 1995). Bakterie, které se typicky volně replikují v cytoplasmě hostitelské buňky střeva, nejsou ohraničené membránou. Nejčastěji se nacházejí v apikální části cytoplasmy. Netvoří inkluze (Gebhart *et al.*, 1993; McOrist *et al.*, 1995). Po obarvení modifikovaným barvivem dle Ziel-Neelsena zachovávají karbolfuchsin a vykazují kyselý charakter. Tato intracelulární bakterie může mít obaly a ty se po obarvení jeví jako světlohnědé. Izoláty *Lawsonia intracellularis* jsou aerobní, rostoucí za optimální přítomnosti kyslíku 8 % (McOrist *et al.*, 1995).

1.3 Výskyt

Onemocnění způsobené obligátně intracelulární bakterií *Lawsonia intracellularis* je celosvětově rozšířeno na všech pěti kontinentech. V České republice bylo poprvé diagnostikováno v roce 1998. V Evropě existuje velmi vysoké procento nakažených prasat a infikovaných hospodářství bez jasných distribučních preferencí této nemoci. V Evropě se

nakazí *L.intracellularis* mezi 34 % až 67 % prasat a minimálně 88 % hospodářství. Nejvyšší procento nakažených prasat a pozitivních hospodářství se nachází v Dánsku, Švýcarsku, České Republice, Řecku a Itálii. Země s poměrně nízkou prevalencí jsou Portugalsko, Anglie a Belgie (Hardge *et al.*, 2006; Prieto *et al.*, 2002).

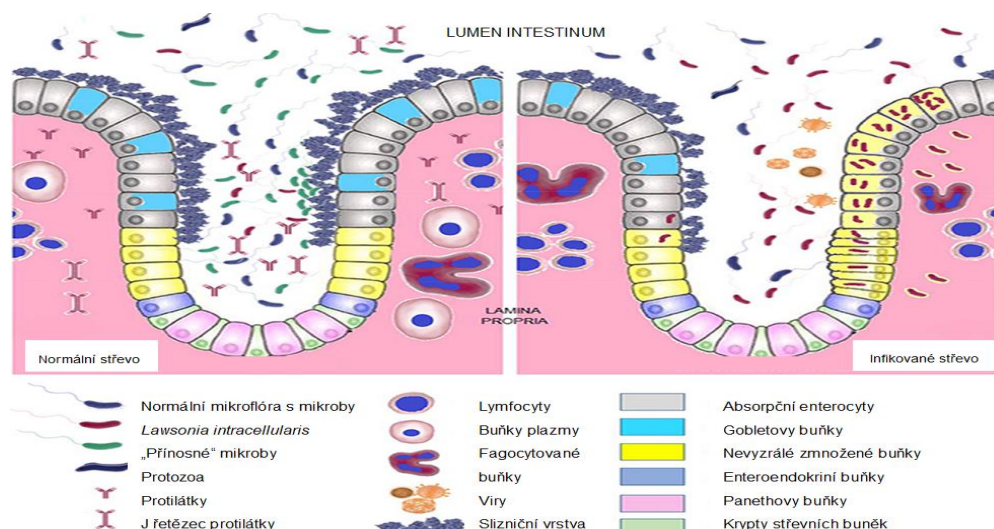
1.4 Patogeneze

1.4.1 Osídlování střevní sliznice

Pohyb je vlastnost, která se považuje za hlavní pro schopnost intracelulárního přežívání patogenů. Je nezbytný pro pronikání bakterií přes slizniční vrstvu a následnou kolonizaci intestinálního traktu a pro vyvolání bakteriální virulence. A proto je těžké vizualizovat, jak konkrétně tato intracelulární bakterie, *Lawsonia intracellularis* může získat vstup do hostitele a vyvolat intestinální onemocnění vzhledem k absenci bakteriálního bičíku a tedy bez chemotaktické síly směrem k slizničnímu povrchu. U extracelulárně umístěných bakterií lze často identifikovat buď dlouhou cytoplasmatickou vakuolu a nebo elektronovou částici o stejné hustotě jakou má cytoplasma ve vakuole. U pozdějších stádií, tedy bakteriích na povrchu sliznice nebo bakteriích v intracelulárním prostoru se však tyto přídatné struktury již nevyskytují. Vzniklá morfologická změna může odrážet nesporné biochemické požadavky na energetické zdroje během extracelulárního přežití a vývoje. Celý tento proces tedy udává, že bičík je úzce regulován, ztrácí se po připojení k hostitelské buňce a znova je resyntetizován až po uvolnění z buňky (Gebhart *et al.*, 1993; McOrist *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 2001).

1.4.2 Připojení k hostitelské buňce

Pro obligátně intracelulární bakterie je nezbytně důležité přisednutí ke specifickým receptorům na hostitelských enterocytech.



Obrázek 1-disbióza pozorovatelná u infekce *L.intracellularis* představuje sníženou či pozměněnou mikrobiotu, inadekvátní mukózní vrstvu enterocytu a nízkou hladinu ochranných protilátek. (Karuppanan, 2018)

Navzdory tomu, že adheziny ani receptory nebyly u *L.intracellularis* zjištěny přisednutí a působení bakterie vyžaduje specifickou interakci s hostitelem (Gebhart *et al.*, 1993). Genomová sekvence *L. intracellularis* naznačuje, že může mít sekreční systém typu III. Tento sekreční systém se běžně vyskytuje u gram-negativních bakterií a napomáhá bakterii během invaze buněk a unikům imunitního systému hostitele. Může také plnit funkci mechanismu pro indukci buněčného dělení (Kroll *et al.*, 2005). Specifické polyklonální sérum společně s monoklonální protilátkou významně snižují infekci v enterocytech a to s největší pravděpodobností indikuje, že do přilnutí k hostitelské buňce jsou zapojeny specifické molekuly imunitní reakce, jak lze vidět na Obrázku 1. Selhání protilátky zcela vylučuje možnost hromadného vstupu bakterií do buňky. Samotné připojení *L.intracellularis* k buňkám je doprovázeno několika morfologickými změnami na povrchu buňky, bakterie vstupují do buňky jednotlivě a dochází ke ztrátě klků. V místě přilehnutí bakterie dochází k zesílení a narušení buněčného okraje (Gebhart *et al.*, 1993; McOrist *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 2001). Neexistují žádné změny na buněčné membráně spojené s adherentně navázanými bakteriemi extracelulárně (Gebhart *et al.*, 1993).

1.4.3 Vstup bakterie do hostitelské buňky

Pod připojenou bakterií k enterocytu se vytváří tlak, který deformuje buněčnou membránu. Při vstupu bakterie do buňky je buněčná membrána zesílena, ale nedochází k jejímu porušení. Takto postupně vytvořená vakuola z buněčné membrány začíná obklopotvat celou bakterií během průniku do cytoplazmy buňky. Intracelulární bakterie *L.intracellularis* pronikají do buňky jednotlivě, ale jakmile se nachází ve vakuole, začíná intracelulární dělení. Vzhledem

k tomu, že volně v cytoplasmě se nacházejí i ostatní přidružené bakterie z rány, zřejmě neexistuje vazba *L.intracellularis* na ohraničující vstupní membránu. Navíc, proces invaze enterocytů nezávisí na životaschopnosti bakterií ale na aktivitě hostitelské buňky, což může naznačovat typ indukované endocytózy (Gebhart *et al.*, 1993; Kroll *et al.*, 2005). Vstup *L.intracellularis* do buněk probíhá podobnými mechanismy jako vstup intracelulární bakterie *Chlamydie trachomatis*. Také některé morfologické znaky jako jsou malé váčky a vezikuly v cytoplasmatické membráně se podobají bakteriím rodu *Chlamydia* (Gebhart *et al.*, 1993; McOrist *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 2001).

1.4.4 Únik z intracelulární vakuoly

Během infekce se *L.intracellularis* vyznačuje tím, že žije volně uvnitř buněčné cytoplazmy. Bakterie uvnitř vakuoly jsou od okolní membrány jasně odděleny elektronovou polaritou a v takovém okamžiku dochází k porušení cytoplasmatické matrice od prázdných vakuol. Rozpad vakuoly nastává krátce po vstupu do hostitelské buňky a po 3 hodinách je většina bakterií téměř výlučně lokalizována v cytoplasmě. Po vakuolárním úniku se bakterie typicky nacházejí v apikální cytoplasmě a kromě některých souvislostí s buněčnými mitochondriemi a hrubým endoplazmatickým retikulem se lokalizují těsně vedle libovolných struktur. I když cytoplasmatická buněčná matrix je obecně těsně sousedící s bakteriální vnější membránou. Mnoho dalších intracelulárních bakterií (*Shigella*, *Listeria*, *Rickettsia*) také vstupuje do cytoplazmy a zde vylučují škodlivé účinky fagolysozomální fúze. Tato aktivita je dána lytickými toxiny (cytolysinem nebo hemolysinem). Únik *L. intracellularis* z vstupní vakuoly do cytoplazmy jednoznačně podporuje produkce podobného faktoru. *L. intracellularis* vykazuje cytolytickou (hemolytickou) aktivitu prostřednictvím exprese nového hemolyzinu A (LhyA). Tento hemolyzin A může být jedním s hlavních faktorů virulence podílejících se na úniku intracelulárních bakterií z vakuol (Gebhart *et al.*, 1993; Kroll *et al.*, 2005; McOrist *et al.*, 1995).

1.4.5 Intracelulární rozmnožování a kolonizace střevního epitelu

Dostupná data naznačují, že bakteriální replikace nově vyvinutých dceřiných buněk se vyskytuje souběžně s replikací infikovaných hostitelských buněk bakterií *L.intracellularis*, proto je nutné zvážit procesy, které jsou základem množení enterocytů (Smith *et al.*, 2001).

Sliznice tenkého střeva je bohatě zřasena a tvoří podélné Kerkringovy řasy, které jsou dále rozčleněny slizničními klky. Ve sliznici se nacházejí tubulózní žlázy neboli Lieberkühnovy krypty. Enterocyty, zralé diferenciované buňky klků tvoří na střevním povrchu kartáčovitý

lem. Buňky v epitelu jsou málo diferenciované a vykazují pouze omezený vývoj kartáčového lemu (Smith *et al.*, 2001).

Orientovaný pohyb *L.intracellularis* do Lieberkühnových krypt spíše než do střevních klků při počáteční infekci může odrážet fyziologické požadavky organismu. Z toho vyplývá, že krypty jsou důležitou oblastí pro přisednutí a vstup bakterií. Takové buňky se dělí a migrují tak, že pomalu osídlují epitel. Pokračující růst a migrace infikovaných buněk je mechanismem, kterým epitely začínají být kolonizovány intracelulární bakterií. Bakterie lze v této fázi pozorovat jako skupiny sousedních infikovaných buněk (Smith *et al.*, 2001; Willians *et al.*, 1996).

Dělicí se enterocyty tak prospívají proliferací bakterií alespoň dvěma způsoby, usnadňují proliferaci bakterií a díky pokračující replikaci a migraci zprostředkovávají šíření bakterií v celé délce epitelu. Tato adaptace je pro *L.intracellularis* vysoce specializovaná. Občas se pozorují bakterie, které se dělí septací v buněčné cytoplasmě lézí, to lze ale pozorovat jen v počátečních fázích infekce (Smith *et al.*, 2001).

Absence bakterií na buněčném povrchu nebo přenos bakterií mezi buňkami a mimo buňku indikují, že bakterie se pohybují pouze v epitelu uvnitř buněk. Proto je migrace infikovaných buněk mechanismem, kterým bakterie a infikované buňky kolonizují epitel (Gebhart *et al.*, 1993; McOrist *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 2001).

Intracelulární pohyb je způsoben u příbuzných bakterií (např. *Shigella* nebo *Listeria*) polymerizovaným aktinem. To se projevuje morfologicky jako dlouhé konce polymerovaného aktinu připojeného ke konci intracelulární bakterie. Mechanismus, kterým napadá *L.intracellularis* epitel, je velmi odlišný (Smith *et al.*, 2001).

1.4.6 Proliferace buněk

Charakteristické pro PE je, že proliferují pouze buňky infikované bakteriemi a v těch místech střevní sliznice, která je narušena hyperplazií. U těžce postiženého epitelu se bakteriální parazitismus a proliferace buněk šíří od báze krypt na povrch epitelu. Buňky krypt se začínají dělit ve zvýšené míře krátce po bakteriální infekci. Zvýšená mitóza pak zvýší populaci buněk až třikrát než u zdravé sliznice. Jakmile se léze plně rozvine tak se stimulační účinek bakterie na buněčné dělení zastaví. A to navzdory přetrvávající přítomnosti intracelulárních bakterií (Guedes *et al.*, 2003). Mechanismus, kterým *L.intracellularis* brání zrání buněk, není znám ale buňky nadále podstupují mitózu a proliferaci a tvoří hyperplastické krypty. Infikované intestinální Lieberkühnovy krypty se mohou stát nesmírně protáhlé a často rozvětvené (Kroll

et al., 2005). Následkem infekce *L.intracellularis* je velice specifická léze projevující se jako hyperplazie. Jediný druh schopný tvořit podobné léze je bakterie rodu *Citrobacter*. Kvantitativní analýzy ukazují, že s vyvíjející se infekcí roste i podíl infikovaných buněk, což znamená, že poukazuje na fakt, že dochází pouze k proliferaci infikovaných buněk a ty se dělí rychleji než neinfikované (Guedes *et al.*, 2003).

1.4.7 Imunitní odpověď

Ze sérových protilátek jako první reaguje IgM ale její krátká životnost dokazuje, že se jedná spíše o reakci na onemocnění, než reakci na infekci. Jako druhá protilátka reaguje IgG. Buněčná imunitní odpověď není výraznější než odpověď humorální. Je však třeba zdůraznit, že jedním z pozoruhodných rysů zvířat usmrčených v časných stádiích s plně vyvinutými proliferativními lézemi je velmi omezená zánětlivá odpověď. Například nedochází k tvorbě CD3 pozitivních lymfocytů, což naznačuje imunopresivní mechanismus. Zvířata postižená akutní hemorhagickou formou onemocnění vykazují silnější odpověď a přítomnost IgM v B-buňkách lymfocytů. Dalším pozoruhodným znakem imunopatologie je přítomnost velkého množství protilátky IgA v enterocytech, chybí důkaz o specifitě tohoto nahromaděného imunoglobulinu ale je to stálý rys při všech projevech onemocnění. Je však stále nejisté, zda je IgA akumulován nespecificky kvůli selhání vylučování nebo je-li přímo stimulovaný organismem. Dalším rysem běžným u počátečních fází je přítomnost antigenu *L.intracellularis* v makrofázích, což naznačuje možnou úlohu vrozené buněčné obrany (Collins *et al.*, 2001).

Rozdíly v imunitní odpovědi mohou také odlišovat nekomplikovanou PIA formu od smrtelné PHE formy onemocnění. Bakterie jsou rozšířenější ve tkáních při formě PHE, objevují se volně, v makrofázích, v lamina propria a také v intestinálních kapilárách a lymfatických buňkách. Rozdíl spočívá částečně v imunitní odpovědi a následné zánětlivé reakci uvedené výše, ale může také být výsledkem variability virulence bakteriálních kmenů (Kroll *et al.*, 2005).

1.4.8 Bakteriální perzistence uvnitř buněk

Proliferační složka lézí PE je přetrvávající, nikoli fulminantní. Epiteliární hyperplazie bývá pozorována nejméně 4 dny od vniknutí bakterie do organismu. Maximální celularita epitelu nastává 30-35 dní po infekci. Téměř veškerý bakteriální antigen je přítomen během většiny stádií onemocnění, zbytek bývá přítomen v makrofázích v lamina propria ale také v Peyerových plátech a lymfatických uzlinách. Perzistence *L.intracellularis* je usnadněna

nepřítomností zánětlivé odpovědi a omezenou imunitní reakcí. Tím, že se bakterie nacházejí intracelulárně, jsou vyřazeny z imunitní odpovědi. *L.intracellularis* přímo ovlivňuje tento proces redukcí exprese MHC II.třídy. Kromě imunologických privilegií se tedy zdá, že *L.intracellularis* aktivně moduluje a snižuje imunitní odpovědi (Gyles *et al.*).

1.4.9 Jiné aspekty patogeneze

Bývají popsány případy duální infekce *L.intracellularis* s dalšími patogeny (koinfekce s kokciemi u fretek, *Trichus suis* u prasat a případně *Chlamydia trachomatis* u křečků). Nejpravděpodobněji k tomu dochází tak, že jeden nebo jiný patogen modifikuje imunitní odpověď a tak dochází k predispozici duální infekce. Deplece slizničních buněk, ke které dochází při závažných lézích PE a související absence fyzikální slizniční bariéry ze střevního povrchu může také změnit citlivost k infekci. Tabulka 1 srovnává některé známé aspekty patogeneze *L.intracellularis* a jiných intestinálních intracelulárních bakterií. Mnoho bakteriálních druhů přijímá poměrně odlišné strategie k zajištění perzistence v intracelulární oblasti (Lawson *et al.*, 2000).

Tabulka 1-Srovnání patogeneze infekce *L.intracellularis* s ostatními infekcemi způsobenými intracelulárními bakteriemi. (Moulder, 1985; Finlay and Falkow, 1989)

Pozorované znaky	<i>Chlamydia</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Shigella</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Lawsonia</i>
Obligátní (O) nebo fakultativní (F) bakterie	O	F	F	F	O
Typ buněk, které napadá	epiteliální	epiteliální a Peyerovy pláty	mukozní epitel	Peyerovy pláty	krypty mukózního epitelu
Pro vstup buněk jsou potřebné životaschopné bakterie	NE	ANO	ANO	NE	NE
Heparin inhibuje buněčnou infekci	ANO	není známo	není známo	není známo	NE
Pro vstup jsou důležité hostitelské mikrofilamenty	částečně	ANO	ANO	ANO	ANO
Místo rozmnožování	cytoplasmatická vakuola	cytoplasmatická vakuola	cytoplasma	cytoplasmatická vakuola	cytoplasma
Přenos z buňky na buňku	omezené dělení	lýzou a reinfekcí	přenos z buňky na buňku	Lýzou a reinfekcí	dělením krypt epitelu střeva
Vývojové formy	ANO	NE	NE	NE	NE

O= obligátní bakterie, F= fakultativní bakterie

1.5 Diagnostika

Nedávno popsaný mikroorganismus *Lawsonia intracellularis* není lehké klasifikovat, protože obligátně intracelulární bakterie nelze kultivovat na agarech ale pouze na stanovených buněčných kulturách s enterocyty potkanů (McOrist *et al.*, 1995). S příchodem citlivých a specifických diagnostických metod byla provedena nová a modernější identifikace

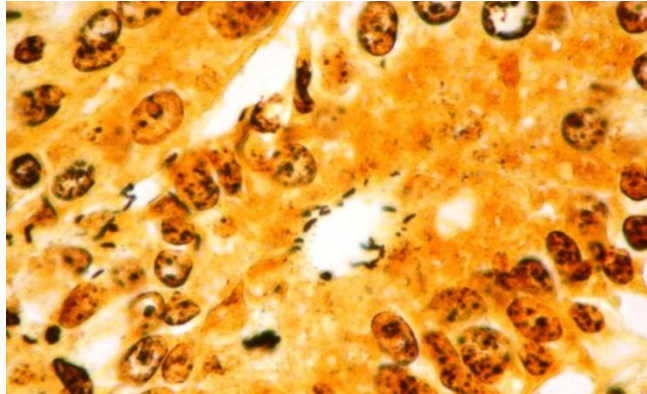
specifických infekcí *L.intracellularis* a posílena prevalence PE v chovech prasat (Kroll *et al.*, 2005).

Klinické příznaky a charakteristické patoanatomické změny mohou být dostatečné pro předběžnou diagnózu. Na tenkém střevě postiženém *L.intracellularis* se nalézají hrubé léze. Dochází k nepravidelnému ztlušťování jejunu a ilea tenkého střeva, přičemž ileum bývá postiženo vážněji. Léze v jejunu bývají mnohohložiskové ve tvaru zahuštěných disků, zatímco distální část jejunu a ileum obsahují difúzně rozptýlené mukózní ztluštění jejichž důsledkem dochází k zvrásnění sliznice (Kroll *et al.*, 2005). Léze jedné z forem PE, intestinální adenomatózy bývají nejčastěji zjištěny už při porážkách, ale nejsou spjaty s onemocněním proliferativní enteropatie. Zatímco přítomnost mezenterického edému souvisejícího se zesílením ilea je cennou indikací tohoto onemocnění (Yates *et al.*, 1979).

Histopatologické vyšetření je nezbytné k zajištění správné diagnózy (Kroll *et al.*, 2005). Poukazuje na nález zesílené sliznice, hyperplastických žláznových struktur společně s nezralými epiteliálními buňkami a deformaci střevních klků. Ve žlázách se nachází proteinová tekutina, pozůstatky poškozených buněk a náhodné neutrofilie. Počet Panethových a pohárkových buněk je výrazně snížen (Williams *et al.*, 1996). Hematoxylinové a eozinové barvení částí tkání postižených výraznou formou PE vykazuje proliferativní změny v enterocytech střev. Modifikované barvení dle Ziehl-Neelsova na sliznicích, ve vzorcích fekálií nebo na fixovaných infikovaných eukaryotických buňkách *L.intracellularis* poskytuje nespěšný, jednoduchý potvrzující test, kdy se intracelulární bakterie v cytoplasmě infikovaných buněk zbarví červeně (Kroll *et al.*, 2005).

Intracelulární bakterie lze nejlépe odhalit v histologických řezech pomocí techniky impregnace stříbrem neboli barvením dle Warthin-Starryho (viz. Obrázek 2) (Bakker *et al.*, 2000; Gebhart *et al.*, 1993). Hledané složky tkáňových řezů jsou schopny na sebe během impregnace vázat ionty stříbra, které jsou poté pomocí vhodného redukčního média konvertovány na elementární stříbro. Vznikající depozita pak barví zakřivené bakterie v apikální části cytoplasmy černě (Kiernan, 2002). Barvení sliznic na základě modifikované techniky dle Ziehl-Nielsena je schopné potvrdit diagnózu bez histologie (Lawson *et al.*, 2000). Po obarvení modifikovaným barvivem dle Ziehl-Nielsena zachovávají karbolfuchsin a vykazují kyselý charakter. Bakterie mohou mít obaly a ty se po obarvení jeví jako světlohnědé. Izoláty *Lawsonia intracellularis* rostou v buněčných kulturách za přítomnosti kyslíku. Optimální přítomností kyslíku je 8 %. Bakterie jsou schopné infikovat buněčné

kultury, ale nedokáží růst na libovolném bezbuněčném médiu za aerobních, mikroaerofilních nebo anaerobních podmínek při různých teplotách. Zabarvení laktátového média nebylo pozorováno v žádném médiu naočkovaném *L. intracellularis* (Gebhart *et al.*, 2010).



Obrázek 2- Ileum- Warthin-Starry barvení ukazující intracelulární bakterie v apikální části cytoplasmy enterocytu. (Dostupné z: <https://vetpath.wordpress.com/2008/08/01/proliferative-ileitis-in-a-pig-lawsonia-intracellularis/>) [cit. 2018-11-06])

Imunohistochemie (IHC) a testy imunofluorescenční protilátky (IFA) umožní specifickou detekci *L.intracellularis* ve tkáňových řezech postižených různými formami PE. Při použití monoklonálních protilátek specifických pro *Lawsonia* mohou být bakterie identifikovány ve vzorcích, které vykazují vysoké hladiny aktivně uvolňovaných bakterií *L.intracellularis*. V rámci použití IHC může být pozitivní antigen *L.intracellularis* detekován i v případech těžké nekrózy, kdy je sliznice zcela zničena nebo během fáze obnovy sliznice, kdy se bakteriální antigen nachází pouze v cytoplasmě mononukleárních buněk v lamina propria (Kroll *et al.*, 2005).

Sérologický nepřímý test fluorescenční protilátky indikuje jako převládající protilátku v počátečních fázích infekce IgM a v menší míře IgA (Kroll *et al.*, 2005). Přítomnost sérové IgM protilátky proti *L.intracellularis* může být použita k diagnostice současného onemocnění u rostoucích prasat. Prasata, která se uzdraví z infekce mají po zbytek života vyšší hladiny protilátky IgM v těle, tudíž přítomnost této protilátky není indikací pro správnou diagnostiku (Guedes *et al.*, 2002). Modifikovaný IFAT k detekci IgG zahrnuje použití obarveného antigenu *Lawsonia* jako primární protilátky a fluorescein isothyokyanát (FITC) značené anti-prasečí IgG (těžké a lehké řetězce imunoglobulinu) jako sekundární protilátky (Kroll *et al.*, 2005). Vazba specifických protilátek *Lawsonia intracellularis* proti antigenu templátu je detekována fluorescenčně značenou specifickou protilátkou protilátky IgG (Guedes *et al.*, 2002). IFAT je přesná a spolehlivá metoda využívající se k detekci po smrti (Kroll *et al.*, 2005).

Sérologický test imunoperoxidázové monovrstvé protilátky (IPMA) byl vyvinut, aby poskytl alternativu k imunofluorescenčnímu testu pro detekci sérokonverze na *L.intracellularis*. Tato analýza je velmi podobná IFAT kromě následujících jako sekundární protilátka je konjugát značený proti IgG peroxidázou (proti FITC), konečná detekce při kterých jsou pozorovány vzorky se liší ve zdroji světla a IPMA vyžaduje ještě jeden krok navíc a to inkubaci s peroxidem vodíku k odstranění endogenní peroxidázy (Kroll *et al.*, 2005). Antispecifická sekundární protilátka je značena peroxidázou, což vede k zhnědnutí substrátu, který je poté hodnocen pod světelným mikroskopem (Guedes *et al.*, 2002; Lawson *et al.*, 1988).

Nedávno vyvinutou metodou, která se k diagnostice využívá stále častěji je kompetitivní blokovací ELISA s použitím dvou různých monoklonálních protilátek proti protilátkovým epitopům *Lawsonia intracellularis*. Tento test umožňuje semikvantitativní sledování populací prasat. *Lawsonia intracellularis*-antigen je vázán na destičku ELISA pomocí specifické monoklonální protilátky. Vzorky séra zředěné podle návodu (1:10) se inkubují s templátem antigenu. Sérové protilátky proti *Lawsonia intracellularis* se váží na antigen. Po odstranění séra se do jamky přidá sekundární peroxidázou značená monoklonální protilátka, která se váže na epitop *Lawsonia intracellularis*, který se liší od epitopu předchozí specifické monoklonální protilátky. V přítomnosti prasečích protilátek, které se předtím vázaly na templát antigenu, žádné nebo jen omezené množství vazebných míst jsou k dispozici pro sekundární monoklonální protilátku, což vede k tomu, že je daleko méně vázána v porovnání s negativním kontrolním sérem (inhibice). Po ukončení inkubace se substrátem vazba konjugované monoklonální protilátky poskytuje žlutou barvu, kterou lze měřit pomocí fotometru. Sérologické testy mají tu výhodu, že jsou poměrně levné a snadno interpretují danou specifitu. Na rozdíl od PCR neumí určit právě probíhající infekci, jen naznačují, že zvíře bylo předtím vystaveno onemocnění (Jacobson *et al.*, 2004; Lawson *et al.*, 1988).

Za referenční metodu diagnostiky proliferativní enteropatie lze považovat PCR. PCR je citlivá, molekulárně biologická metoda pro detekci DNA schopna detekovat nízké hladiny mikrobiálních patogenů, zejména těch intracelulárních. DNA je extrahovaná z fekálních a mukózních vzorků, stejně jako z různých tkání včetně ilea, tlustého střeva, mandlí, jater a lymfatických uzlin (Kroll *et al.*, 2005). Použití komerčních kitů pro přípravu DNA obvykle zlepšuje kvalitu a reprodukovatelnost extrakce DNA. DNA je před dalším zpracováním skladována při -20 °C (Jacobson *et al.*, 2004). Primery jsou navrženy tak, aby se zaměřily na specifické jedinečné sekvence DNA založené na 16S rDNA. Používají se dvě sady primerů, externí sada primerů, která amplifikuje fragment DNA o velikosti 319bp a vnitřní sada

primerů amplifikující 255-bp fragment. Metoda PCR je užitečným diagnostickým nástrojem pro identifikaci prevalence *L.intracellularis* ale nedokáže detekovat jedince, u nichž se *L.intracellularis* nevyskytuje v organismu. Sady primerů specifické pro *Lawsonii intracellularis* se používají k amplifikaci genomových fragmentů, které mohou být vizualizovaný pomocí Real Time PCR pomocí značených detekčních primerů nebo elektroforézou na agarozovém gelu za vizualizace DNA ethidiumbromidem. Metody Real Time PCR jsou atraktivnější než konvenční PCR protože umožňují okamžité potvrzení pozitivních vzorků proti bakterii *Lawsonia intracellularis* a poskytují možnost kvantifikace (Kroll *et al.*, 2005). Výhodou PCR je určení, zda prase současně trpí aktivní infekcí. Nevýhodou je provozní cena a nízká citlivost při subklinických a chronických formách onemocnění (Jacobson *et al.*, 2004).

Před vývojem PCR se pro detekci genomové DNA specifické pro *L.intracellularis* ve výkalech používala technika hybridizace DNA. DNA byla extrahována ze vzorků výkalů a navázána na nylonovou membránu a poté vzorek s dioxigeninem označen sondou s bakteriální DNA *L.intracellularis*. Bylo vyvinuto enzymově vázané oligosorbentní stanovení (ELOS), aby specificky identifikovalo 328-bp amplifikovaný fragment *L.intracellularis* DNA v klinickém vzorku (Kroll *et al.*, 2005).

Imunologická metoda s použitím imunomagnetické separace pomocí magnetických částic potažených protilátkou anti-LsaA a následné ATP bioluminiscence byla vyvinuta pro zachycení celých buněk *L.intracellularis* ve fekálních vzorcích. Tato metoda by mohla být užitečná jako alternativa k PCR pro detekci aktivních infekcí *L.intracellularis* (Kroll *et al.*, 2005).

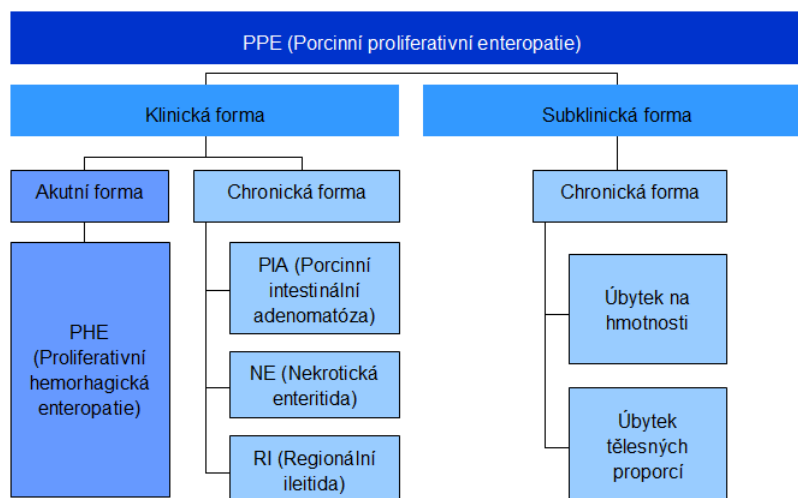
2 PORCINNÍ PROLIFERATIVNÍ ENTEROPATIE

Porcinní proliferativní enteropatie je onemocnění postihující zvláště prasata vyvolané touto obligátně intracelulární bakterií *Lawsonia intracellularis* (Bane *et al.*, 1998). Název onemocnění byl odvozen tak, aby co nejpřesněji popisoval základní léze viditelné u všech prasat (Collins, 2000).

Bakterie je obvykle vylučována fekáliemi nakažených zvířat a dále se šíří tak, že tyto výkaly kontaminují rypák dalšího jedince, tedy fekálně-orální cestou. Různorodost viditelných typů proliferativní enteropatie závisí na infekční dávce, věku zvířete a sekundárně přidružených onemocnění (Collins, 2000).

Pro PE je charakteristická proliferace epiteliálních buněk v kryptách střevní sliznice distální části ilea s následným ztluštěním tenkého střeva. Konečným stádiem bývá nekrotická ileitida. Onemocnění se vyskytuje ve dvou formách, jak je naznačeno na Obrázku 3. Klinické onemocnění se pak projevuje jako akutní forma- proliferativní hemorhagická enteropatie (PHE) a v chronické formě jako intestinální adenomatóza prasat (PIA) (Collins *et al.*, 1999). U některých prasat může PIA vést k nekrotické enteritidě (NE) nebo regionální ileitidě (RI) (Lawson *et al.*, 1993). Toto onemocnění vždy vykazovalo neobvyklé patologické znaky a trvalo přes 40 let podrobněji poznat a popsat rozdíly mezi PHE a PIA. Výskyt syndromu hemorhagické enteropatie, u kterého střevní sliznice vykazovala proliferaci nejprve upozornil na podobnou nemoc, která se někdy objevovala v epidemické podobě (Cooper *et al.*, 1998).

Počáteční infekce bývá obvykle ve věku 6 až 20 týdnů pro chronickou ileitidu a 3 až 12 měsíců pro akutní ileitidu. Inkubační doba ileitidy je 2 až 3 týdny. Ileitidy, zapříčiněné *Lawsonia intracellularis* jsou zřetelně prokazatelné vždy po odstavení mláděte od matky. Prasata, která se dostanou do kontaktu s touto bakterií v pozdějším věku mohou vykazovat rozšířené klinické příznaky (Collins, 2000).



Obrázek 3- Formy Porcinní proliferativní enteropatie. (Dostupné z: <http://www.thepigsite.com/publications/2/ileitis/129/41-what-forms-of-ileitis-are-known/> [cit. 2018-11-06])

Akutní hemorhagická forma se obvykle vyskytuje u neinfikovaných prasat, starších dvanácti týdnů, která se nakazí perorální cestou. Chronické a subklinické formy se obecně vyvíjejí u mladších prasat, která se nakazí fekální cestou po pozření malého či středního množství bakterií (Collins, 2000).

V porovnání s jinými perorálně-fekálními enterálními organismy má *L.intracellularis* nízkou infekční dávku a ve stolici přetrvává často až po dobu 2 týdnů. Zvýšení infekční dávky má za

následek stále závažnější onemocnění probíhající prostřednictvím subklinické, klinické a akutní hemorhagické formy (Collins, 2000).

Předpokladem zvládnutí zdravotní situace v postiženém chovu je uplatňování celého komplexu organizačních, technologických, krmivářských, zoohygienických a veterinárních postupů, opatření a jejich funkční propojení. Sladit však působení všech vnějších vlivů s optimálními potřebami prasat je neuvěřitelně těžkou prací (Pozo *et al.*, 2002).

2.1 Epizootologie

Gram negativní bakterie *Lawsonia intracellularis* vstupuje do organismu perorální cestou, až do tlustého střeva, kde se množí a uvolňuje své toxiny. Přenáší se kontaminovanými výkaly, krmivem nebo vodou a nesprávně organizovanou přepravou (Guedes, 2004).

Hlavním zdrojem nákazy jsou klinicky nemocná prasata, která rozšiřují *L.intracellularis* na ostatní vnímavá prasata cestou fekálně-orální. Prasnice a kanci pravděpodobně hrají úlohu asymptomatických nosičů a přenáší infekce na vnímavá selata. Na nákaze se také může podílet i ošetřující personál nedodržující hygienu a hlodavci, hmyz nebo ptáci, kteří mohou vylučovat původce onemocnění i celých rok (Guedes, 2004). Průměrný evropský séroprofil vykazuje nejvyšší procento onemocnění u prasnic (Prieto *et al.*, 2002).

U chronicky postižených chovů není onemocnění tak závažné, protože selata od chronicky postižených prasnic bývají chráněna protilátkami z mléka (Jacobson, 2003). Předpokládá se, že mateřské protilátky přítomné při odstavu zmizí ve většině případů do 6. týdne života (Prieto *et al.*, 2002).

S ohledem na dobu mezi infekcí a průkazem protilátek v séru bývají obligátně intracelulární bakterií prasata infikována těsně po odstavu, se zařazením do výkrmu. Ve 13. týdnu života je každé 4. prase v Evropě již infikováno *L.intracellularis*. Poté dochází k téměř lineárnímu navyšování až do doby porážky. Morbidita u infikovaných neléčených chovů je vysoká až 90 % s nárůstem mortality do 50 % (Prieto *et al.*, 2002).

Lze předpokládat, že pozorovaný vzorec infekce je způsoben poměrně pomalým ale opětovným vystavením zdravých jedinců rostoucímu počtu infikovaných zvířat. Ve venkovních chovech, kde jsou šance na opakovanou expozici nižší je riziko infekce i séroprevalence výrazně nižší než u intenzivně řízených halových chovů (Prieto *et al.*, 2002).

Zatímco v USA výskyt ileitidy prasat vykazuje trvale klesající tendenci, v evropských státech začíná být poměrně značnou problematikou. Nejvíce postižených farem tímto onemocněním

se nachází v Dánsku, Švýcarsku, České republice, Řecku a Itálii. Vzhledem k tomu, že v Evropské Unii byl vydán zákaz používání antibiotických stimulátorů růstu (tj. olaquinoxu, dimetridazolu, ronidazolu) dá se v krátké době očekávat další nárůst onemocnění (Prieto *et al.*, 2002). U většiny prasat, která nevykazují typický příznak průjmů je subklinická ileitis pravděpodobně nejčastější formou ileitidy v praxi. Tedy k vylučování zárodků může docházet nezávisle na přítomnosti či nepřítomnosti klinických příznaků (Jacobson, 2003). Široké rozšíření infekce naznačuje, že onemocnění je endemické (Prieto *et al.*, 2002).

2.2 Prevalence

Odhadovaná prevalence onemocnění a infekce *L. intracellularis* závisí na použité diagnostické metodě. Kontroly porážky, založené pouze na detekci hrubých lézí ukazují, že 5 až 20 % prasat je postiženo onemocněním PE. Kontroly porážky však významně podhodnocují subklinickou formu onemocnění protože léze PE se vyskytují během dvou až čtyř týdnů od přítomnosti klinických příznaků (Collins, 2013). Hospodáři a veterináři, zaměřující se na strategii kontroly nákazy většinou odhadují, že klinické onemocnění převažuje v rozmezí 30 až 56 % stáda (Class *et al.*, 2004). Sérologické preventivní průzkumy prasat před koncem výkrmu naznačují, že více než 80 % prasat je infikováno *L. intracellularis* (Collins, 2013). V Evropě bývají jako séropozitivní nejčastěji detekovány prasnice a kanci (79 až 85 %). Nejnižší výskyt bývá zjištěn u selat na počátku a na konci odstavu (10 až 15 %) (Class *et al.*, 2004). Naproti tomu detekce DNA *L. intracellularis* ve výkalech pomocí PCR naznačuje, že 4,5 až 45 % stád je infikováno *L. intracellularis* a prevalence infikovaných zvířat se pohybuje mezi 3,3 a 12 % (Collins, 2013). S počátkem výkrmu dochází k jasnému zvýšení prevalence z 10 na 25 % v průměrném evropském sérotypu (Class *et al.*, 2004).

2.3 Patogeneze

Proces patogeneze byl detailně popsán výše. Hlavním patogenním mechanismem je infekce a hyperplazie enterocytů. Obecně není zaznamenána žádná významná zánětlivá odpověď a infekce zůstává lokalizována v enterocytech (Jacobson, 2003).

2.4 Klinické příznaky

Nejtypičtějším klinickým příznakem PE je průjem. Feces se skládají z vody a sušiny tj. přijatého krmiva. Průjem se objevuje, když postižená prasata mají patologické změny ve střevech, zejména v tlustém střevě, což narušuje schopnost regulovat hladinu vody ve výkalech. Průjmy způsobené ileitidou jsou obecně mírné, s rozvolněným pastovitým, špatně tvarovaným výkalem normální barvy. V závažnějších případech se fekálie stávají vodnatější.

Výsledkem je vodnatá neupravená struktura. Výkaly mohou obsahovat nestrávené složky krmiva jako je pšenice, ječmen, kukuřice, které ale nemají žádný skutečný vliv na vývoj nemoci. Důležitou skutečností zůstává výskyt krve nebo lepkavého hnědého hlenu poukazující na formu onemocnění. Průjem způsobený *Lawsonii intracellularis* je poměrně dobře odlišitelný od průjmu způsobeného bakteriemi *E.coli*, jež bývá mnohem vodnatější a žlutý a vyskytuje se u prasat obvykle 1 až 2 týdny po odstavu. Průjem způsobený bakterií *Brachyspira hyodysenteriae* se objevuje ve stejném věku prasat jako ileitidy ale typicky obsahuje čerstvou krev s příměsí hlenu (La *et al.*, 2004).

2.4.1 Chronická forma (PIA)

Chronická a nejčastější forma PE se nazývá porcinní intestinální adenomatóza. Tato forma se běžně vyskytuje u selat a selat po odstavu, neboli běhounů ve věku 6 až 20 týdnů, od pozdního odstavu až po stádia ve výkrmu (Beister *et al.*, 1931).

Klinická pozorování chronické ileitidy obecně zahrnují příznaky řídkých průjmů s nestrávenými složkami krmné směsi, nechutenství, snížené přírůstky hmotnosti, ztrátu kondice, anorexie, apatie, celkovou skleslost a poruchy růstu (Beister *at el.*, 1931). Morbidita postihuje 5-20 % chovných prasat. Mortalita nepřesahuje 10 % (Jacobson, 2003).

Léze chronické ileitidy se vyskytují nejčastěji v 50 cm terminálního ilea tenkého střeva a horní třetině proximálního tlustého střeva, zahrnující část slepého střeva. Rozsah proliferace se značně liší, ale u pokročilých lézí je stěna viditelně zesílena a zvětší se celkový průměr střeva. Zasažená sliznice je spřažena do podélných nebo příčných hlubokých záhybů. Toto charakteristické, viditelné zesílení související s proliferací ustanovilo název intestinální adenomatóza. Povrch sliznice je vlhký, nikoli mukózní. Na povrchu se objevují volně přilnavé skvrny zánětlivých exsudátů smíchané s fibrinem. Peyerovy pláty mohou být členěny. Patologické léze PIA se skládají z intestinálního slizničního zesílení a epiteliální proliferace, ale relativně bez zánětu nebo jen mírně zanícených na povrchu sliznice (Class *et al.*, 2004).

U malých lézí by se měla vyšetřovat oblast terminálního ilea, 10 cm od proximálního ilea k ileocaecální oblasti protože toto je nejpravděpodobnější místo mírné infekce. U některých prasat s ileitidou se může vyvinout závažnější forma, kde se na základě chronické proliferativní léze vyskytují sekundární infekce jako *Fusobacterium necrophorum*, *Actinomyces* spp. nebo *Bacteroides* spp. vytvářející zánět (Beister *et al.*, 1931).

Histologický nález ukazuje ztlustělou sliznici s epiteliárními buňkami a Lieberkühnovy krypty, v nichž probíhá hojné mitotické dělení. Mezi enterocyty zcela chybí pohárkové buňky. Typickým nálezem každého histologického preparátu jsou intracelulární bakterie v apikální části cytoplasmu postižených epiteliálních buněk (Lawson *et al.*, 2000).

Často v rámci neléčeného onemocnění dochází ke zhoršení zdravotního stavu a ke vzniku nekrozní enteritidy. Nekrozní enteritida je považována za výsledek PIA v konečném stádiu nemoci. Na povrchu mukózní výstelky terminálního ilea se vyskytuje koagulační nekróza s výraznými zánětlivými exsudáty. Tyto exsudáty mají vzhled žlutozelené sýrové hmoty, která těsně přilne ke sliznici. Zbytky proliferativního epitelu v hlubokých vrstvách potvrdí diagnózu NE způsobené ileitidou (Jacobson, 2003).

U některých prasat s ileitidou se střevní stěna stává pevnou a fibrotickou, avšak v těchto případech často dochází k atrofii sliznice. Tato forma se nazývá regionální ileitis (Jacobson, 2003).

Chronická forma je obzvláště běžná v chovech s tradičně stavěnými prostory, takzvaně „od porodny k jatkám“, které se nacházejí na jednom prostoru. Tím je zajištěn přenos onemocnění z prasete na další prase (Karuppannan *et al.*, 2018).

U nekomplikovaných případů dochází za 4 až 6 týdnů k uzdravení. Na střevech ovšem zůstávají patologické změny, tím je zhoršena konverze krmiva a nárůst nižších přírůstků (Jacobson, 2003).

2.4.2 Akutní forma (PHE)

Akutní forma ileitidy je mnohem dramatičtější a závažnějším typem onemocnění. Proliferativní hemorhagickou enteropatií nejčastěji onemocní starší prasata ve věku 4 až 12 měsíců. Vzplanutí PHE formy se nejčastěji vyskytuje u prasat o hmotnosti 60-90kg a prasniček 4 až 6 týdnů po nákupu, v období připouštění a rané gravidity. Průběh bývá velmi akutní s vysokou četností několika případů probíhajících zároveň. K propuknutí této formy obvykle dochází po perorálním kontaktu nenakažených, zdravých prasata starších 12 týdnů s významným množstvím *Lawsonie intracellularis* od infikovaných prasat (Jacobson, 2003).

Charakteristickým projevem u prasat postižených akutní ileitidou jsou rozsáhlé střevní krevní výlevy. Fekálie jsou rozvolněné a ztrácí původní tvar výkalu. Část prasat umírá do 48 hodin a jedinými příznaky jsou bledá kůže a sliznice vlivem ztráty krve s výkaly způsobující výrazné anémie. Druhá část má krvavé výkaly ale mortalita je nízká. U části prasat s akutním

průběhem je mortalita až 50 %. V případě subakutního průběhu mají prasata tmavě dehtovité zbarvení výkalů, které se postupně vytrácí ale jejich konzistence se mění na vodnatou. U březích prasnic dochází k potratům, zpravidla 6. den po manifestaci klinických příznaků (Yates *et al.*, 1979).

PHE typicky postihuje terminální ileum a proximální část tlustého střeva. Střevo je zduřelé, s mukózním ztluštěním a serózním edémem. To je velmi podobné jako u těžké chronické ileitidy. Při akutní formě je dodatečnou změnou to, že lumen ilea a tlustého střeva obsahuje jednu nebo více krevních sraženin. Ty se často mísí s ostatními krevními elementy, fibrinem nebo nestrávenými částičky potravy. Rektum může obsahovat černou, dehtovou stolicí, také se smíšenou krví a natrženinou (Lawson *et al.*, 2000).

Histopatologické léze jsou charakterizovány adenomatózní proliferací epitelu v kryptách tenkého střeva a v mukózních žlázách tlustého střeva s přítomností zakřivených intracelulárních bakterií. Krypty jsou prodlouženy, zvětšeny a obloženy přeplněnými nezralými epiteliálními buňkami. Pohárkové buňky nejsou přítomny (Lawson *et al.*, 2000).

Oddělení věkových skupin u moderních chovů je faktorem, který může být důležitý pro výskyt PHE. To má příznivý přínos pro výrazné snížení mnoho onemocnění ale jakmile je prase postiženo, jeho hemorhagické výkaly obsahují velmi velké množství *L.intracellularis*, které způsobují rychlé šíření bakterií a infekce (Jacobson, 2003).

2.4.3 Diferenciální diagnóza

Existují některá běžná onemocnění prasat způsobená jinými původci než *Lawsonia intracellularis*, která vykazují podobné klinické příznaky a tak vzniká potřeba spolehlivého odlišení těchto onemocnění. Náhlá smrt spolu s průchodem krvavé stolice může být způsobena žaludečními vředy nebo intestinální torzí. Nejběžněji vyskytující se enteritidy jsou Salmonelóza prasat a infekce *E.coli* u odstavených selat (Collins *et al.*, 2000).

Častým onemocněním ve věkové skupině od 6 do 20 týdnů je Dyzenterie prasat. Infekce způsobená bakterií *Brachyspira hyodysenteriae* je omezena na tlusté střevo a neovlivňuje ileum, což je důležitý rozlišovací znak mezi dyzentérií prasat a proliferační ileitidou. Onemocnění se obvykle šíří od jiných prasnic ve výkrmu a na rozdíl od infekcí způsobených bakterií rodu *Lawsonia* je obvykle 30 až 50 % prasat postižených vodnatými průjmy. Histologické léze mají určité podobnosti s infekcemi *Lawsonia intracellularis* ale *Brachyspira* jsou pouze příležitostně pozorovány v pohárkových buňkách tenkého střeva (Fellstroem *et al.*, 2002).

Dalšími onemocněními způsobujícími enteritidy jsou např. Klasický prasečí mor u kterého jsou léze v ileu a tlustém střevě nerozlišitelné od těch způsobených proliferativní enteropatií nebo Porcinní Coronavirus prasat, který může za určitých okolností ovlivnit tlusté střevo a způsobit katarální až fibrinózní kolitidu. V roce 1990 byl identifikován Porcinní Circovirus 2 způsobující granulomatózní záněty Peyerových plátů. Od onemocnění způsobené *Lawsonia intracellularis* lze ovšem odlišit histologickým vyšetřením s nálezem charakteristických infiltrací epiteloidních makrofágů s obřími mnohojadernými buňkami (Pearson, 2012).

2.5 Léčba

Bylo stanoveno několik rizikových faktorů, kterými predisponují prasata náchylná k infekci *L.intracellularis*. Různá kontrolní a preventivní opatření, jako je použití antimikrobiálních látek, které jsou účinné proti *Lawsonia intracellularis*, byly zavedeny v systémech produkce prasat po celém světě a úspěšně snižovaly nebo předcházely infekcím *L.intracellularis*. Rostoucí globální tlak ke snížení nebo úplnému odstranění rutinního užívání antibiotik jako růstových stimulantů a profylakticky účinných látek u zvířat určených k produkci potravin a potencionální předpisy týkající se subterapeutických antibiotik přiměl hospodáře, výrobce a veterináře k přehodnocení účinného potlačení ileitidy. Změny stravy, používání vakcín a dezinfekčních prostředků se na základě současného porozumění životního cyklu bakterie ve střevech a z pohledu ekologie zdají být úspěšnou alternativou ke snížení a eliminaci *L.intracellularis* u prasat bez kontinuálního používání antimikrobiálních látek (Karuppanan *et al.*, 2018; Kroll *et al.*, 2005). Profylaxe proti infekci *L.intracellularis* se dosáhne buď podáváním subterapeutických hladin růstových stimulantů v krmivech nebo vakcinací (Karuppanan *et al.*, 2018).

Léčba PE může být zvažována dvěma způsoby (Pearson, 2012).

V chovech prasat ve kterých je přechováván obtížně odstranitelný zdroj infekce může být obtížně odstranitelná mortalita ovlivňující klinické účinky onemocnění (Pearson, 2012). Tím je vyžadována okamžitá izolace nemocných jedinců a nepřetržitá terapie pomocí antibiotických přípravků, například Tiamulinem v dávce 200ppm. (Collins, 2013; Pearson, 2012).

U dospělých jedinců postižených akutní formou (PHE) je cílem minimalizovat mortalitu a snížit pravděpodobnost navrácení onemocnění. U takových prasat, která se věkově blíží k jatečnému procesu je nepřetržitě používání antibakteriálních látek nepřijatelné (Pearson,

2012). V takových případech se podává chlortetracyklin v dávce 300-400 ppm po dobu dvou týdnů (Lawson *et al.*, 2000).

Různé komerčně dostupné dezinfekční prostředky na bázi kvarterních amonných sloučenin (Roccal-D Plus, DC&R, Synergize), aldehydů (DC&R, Synergize), oxidačních činidel (VirkonS), fenolů (Tek-Trol), jodu (Cetridine), chloru, peroxymonosulfátu, fosfátových a sulfátových sloučenin účinně inaktivují *L.intracellularis*. Pro umožnění bakteriální inaktivace je minimální doba kontaktu 10-30 min při tvrdosti vody přibližně 400ppm uhličitanu vápenatého. Zvýšení tvrdosti vody mírně snižuje účinnost inaktivace několika dezinfekčních prostředků (Kroll *et al.*, 2005).

Z velké části se onemocnění léčí antibiotiky. Vhodné preparáty musí snadno pronikat membránami buněk a hromadit se v cytoplazmě, aby mohly působit na ribozomy bakterií tak, že vyblokují jejich proteinovou syntézu uvnitř buněk (Jacobson, 2003). Mezi používaná a účinná antibiotika patří penicil, erytromycin, enrofloxacin a chlortetracyklin. V mnoha případech se v rámci léčby využívá i růstových promotorů jako je bacitracin, virginamycin nebo salinomycin ovšem nikdy nebylo prokázáno, že mají skutečný účinek na samotné onemocnění (Lawson *et al.*, 2000; McClintock *et al.*, 2004). Důležité však je pamatovat na to, že je nutné volit správnou látku v doporučené dávce s ohledem na průběh onemocnění (McClintock *et al.*, 2004).

Nejrozšířenější formou podání pro akutní i běžné chronické onemocnění stále zůstává perorální podání antibakteriální látky do krmiva v podobě tzv. premixů, tedy směsí doplňkových látek s nebo bez nosičů. Jako účinný přípravek se projevilo spojení premixů Tiamulin, Tylosin a Lincomycin pro kontrolu a prevenci ileitidy na mnoha farmách po celé Evropě (Paradis *et al.*, 2004). Je možné, že se tyto léky koncentrují v enterocytech infikovaných bakterií *Lawsonia intracellularis*. Po odstranění těchto antibiotik však zůstávají prasata imunologicky prostá a jsou náchylná k pozdějšímu výskytu infekce *L.intracellularis* (Jacobson, 2003).

Veřejné znepokojení nad vývojem antibiotické rezistence vůči bakteriím vedlo k celosvětovému tlaku na nalezení alternativní strategie pro regulaci PE a snížení profylaktického užívání antibiotik. Proto bylo navrženo aby imunita mohla být vyvolána přivedením mladých zvířat do styku se zdrojem infekce po dobu tří týdnů před přidáním antibiotik k ukončení infekce (Collins, 2013). Živá, oslabená, inaktivovaná vakcína, podávaná perorálně prostřednictvím pitné vody nebo společně s krmivem má schopnost indukovat jak

specifické humorální (IgA, IgG), tak buněčně zprostředkované (IFN- γ) imunitní odpovědi v séru a střevní sliznici (Collins, 2013; Haugegaard *et al.*, 2000). Na základě korelace hladin imunoglobulinů u perorálně nebo intramuskulárně vakcinovaných prasat s lézemi v ileu se jako hlavní způsob působení živých oslabených vakcín doporučuje neutralizace. Orální, intramuskulární nebo intraperitoneální způsob vakcinace vyvolává obdobné odpovědi v imunoglobulinech IgG. Avšak perorální nebo intraperitoneální podání indukuje výrazně vyšší odpověď IgA (Karuppanan *et al.*, 2018). Navzdory několika nedostatkům se ukázalo, že živé, oslabené a inaktivované vakcíny snižují výskyt průjmů, histologické léze PE a částečně zabraňují vylučování *lawsonii* výkaly a výrazně snižují jejich počet (Haugegaard *et al.*, 2000; Karuppanan *et al.*, 2018). Avšak vakcíny *L.intracellularis* neposkytují stálou imunitu a dochází k vyžadování dalších zásahů k regulaci ileitidy (Karuppanan *et al.*, 2018).

Výživové doplňky, jako jsou fyto-genní přísady nebo esenciální oleje se nyní čím dál častěji používají při léčbě mnoha chorob zvířat. Mnoho alternativních kontrolních látek, jako jsou prebiotika, probatika, okysličovadla a mannany (oligosacharidy) se nyní používají pro léčbu nekrotické enteritidy (Karuppanan *et al.*, 2018).

Všeobecné požadavky na úspěšný výsledek vakcinace spočívají v následujících imunologických znalostech (Haugegaard *et al.*, 2000). Nejprve je nutné zahájit aktivaci antigen-prezentujících buněk k tomu, aby mohlo dojít ke zpracování antigenu a tvorbě interleukinů. Konkrétně dochází k aktivaci jak T lymfocytů, tak B lymfocytů za účelem dosažení vysoké produkce paměťových buněk. Produkce T-helpers a T-cytotoxických lymfocytů je klíčová k překonání změny v imunitní odpovědi a při tvorbě B lymfocytů, ke které dochází v lymfoidní tkáni následně dochází k obrovské produkci protilátek (Haugegaard *et al.*, 2000)

Komplikace způsobuje neadekvátní podání množství účinné látky, sekundárně přidružené onemocnění k proliferativní enteropatii nebo pozdní podání antibiotik, kdy už antibiotikum není efektivně využito a to pak vede k domněnce, že *Lawsonia intracellularis* je rezistentní vůči léčbě antibiotiky (Connor, 1991).

2.6 Prevence a monitoring

V případě řešení proliferativní ileitidy, ale u jiných onemocnění obecně platí tyto tři postupné kroky (Žižlavský *et al.*, 1999)

2.6.1 Prevence zavlečení infekce do chovu

Plemenná a užitková zvířata by se měla nakupovat z chovů prostých proliferativní enteropatie. Prasnice a kance ustájit do karantény po dobu 30 dní nebo nově pořízená zvířata automaticky přeléčit účinnými antibiotiky (Žižlavský *et al.*, 1999). To je v současné době téměř neřešitelný problém, protože účinné vakcíny, které by byly plně protektivní proti vzniku klinického onemocnění a současně by řešily stav asymptomatického nosičství nejsou dostupné (Connor, 1991).

2.6.2 Redukce šíření infekce v chovu

Pokud dojde k zavlečení nákazy do chovu, je nejprve nutné zabránit přenosu infekce na ostatní kategorie prasat na farmě vytvořením organizačních opatření (dezinfekce, deratizace, dezinfekce a hygiena personálu) a tlumit klinické onemocnění antibiotickou medikací. Po zvládnutí těchto opatření záleží na rozhodnutí vedení chovu, zda bude nadále pouze tlumit klinickou manifestaci ileitidy nebo přistoupí k eradikačnímu programu (Žižlavský *et al.*, 1999).

2.6.3 Eradikace infekce z chovu

Eradikační program je soubor organizačních opatření, antibiotické medikace a sanace vnějšího prostředí. Principem eradikačního programu je zabránit přenosu onemocnění z prasnic na selata a na ostatní kategorie prasat na farmě a zamezit reinfekci z vnějšího prostředí. Každý eradikační program musí dle technologických možností chovu zvládnout a řešit tzv. kritické momenty (Žižlavský *et al.*, 1999).

Mezi kritické problémy, které řeší eradikace patří např. přežívání původce *Lawsonia intracellularis* ve vnějším prostředí. Mělo by se zabránit průniku jiných zvířat, která mohou být rezervoárem nákazy na farmu. Provádí se všeobecná opatřeními jako je dezinfekce prostředí, používaného náčiní a minimalizace pohybu na farmě, deratizace a desinsekce (Connor, 1991; Žižlavský *et al.*, 1999).

Při subklinicky probíhajících formách onemocnění dochází v chovu k asymptomatickému nosičství (Connor, 1991; Yates *et al.*, 1979). Hospodáři po celém světě přejímají komplexní program preventivních opatření jako je přeléčení nakoupených prasnic a kanců v karanténě. Nakoupená selata se přeléčí před přesunem v dodavatelském chovu (Žižlavský *et al.*, 1999). Nemělo by docházet k segregaci nemocných jedinců dle věkové skupiny jak je tomu u jiných zvířat právě kvůli náchylnosti k vypuknutí subklinické PHE (Connor, 1991; Yates *et al.*,

1979). Každý případ onemocnění PE se musí hlásit a nemocná zvířata oddělit od zdravých jedinců (Žižlavský *et al.*, 1999).

Poskytnutím odpovídajícího prostředí včetně úkrytu a pohodlného místa k odpočinku by měly být minimalizovány environmentální stresy a nerušený přístup k čerstvé vodě a krmivu vede ke všeobecné spokojenosti prasat a přispívá ke snížení vývoje onemocnění. Vhodné také je vyvarovat zvířata stresů při dopravě, včetně třídění nebo míchání skupin prasat (Connor, 1991).

Čistota a dezinfikování jednotlivých ohrádek mezi turnusy prasat přispívá ke snižování míry expozice a tím snižuje možnost vývoje endemického onemocnění. *L.intracellularis* může přežít v konvenčních ohrádkách po dobu nejméně dvou týdnů při teplotách 9°C a 18°C (Collins, 2013). Ohrádky by se měly udržovat co nejsušší. *Lawsonia intracellularis* je citlivá na kvartérní amoniové sloučeniny, nikoliv však na fenolické dezinfekční prostředky. Umytí ohrádky s použitím detergentu se jeví jako nejlepší metoda (Collins, 2013; Žižlavský *et al.*, 1999). Chov na betonových rostech, desinfekčním oxidačním činidlem Virkonem S a řádně osušených významně snižují přežívání a přenos *L.intracellularis* z prostředí na nenakažená zvířata (Collins, 2013).

Načasování podání účinného antibiotika nebo vakcíny by mělo být synchronizováno a pokud se vyskytnou nějaké problémy, mělo by se s podáním začít týden předtím, než se obvykle objeví příznaky. Současně s tím přichází potřeba zajistit správné dávkování antibiotik u jednotlivých kategorií prasat dle skutečné denní spotřeby krmné směsi nebo vody (Collins, 2013).

Avirulentní živá vakcína je dostupná a zdá se, že má velmi dobrou účinnost při řádném podávání vodou nebo perorálně. Vakcinace rostoucích a chovných prasat bývají při snižování nebo eliminaci klinických příznaků velmi úspěšné (Hardge *et al.*, 2004).

Sledování chovu s endemickým statusem PE zahrnuje pravidelné vyhodnocování podezřelých prasat a měsíční sérologický stav. Včasné rozpoznání klinických případů a jejich oddělení od ostatních náchylných prasat nejlépe až do úplného uzdravení nebo minimálně po dobu vylučování patogenu fekáliemi je logickým opatřením biologické bezpečnosti, které zabrání šíření a kontaminaci životního prostředí (Collins, 2013).

Monitorování expozice *L.intracellularis* by mělo začít nejméně 4 týdny před detekcí prvních příznaků. Nedostatek epidemiologických dat týkajících se potencionálních přírodních zdrojů

brání k zavedení jakýchkoli změn hospodaření na endemických farmách. V současnosti neexistuje široce dostupný způsob jak monitorovat velké množství zdánlivě zdravých, podezřelých jedinců. Sérologické testy mohou být užitečné při identifikaci infikovaných stád. PCR může identifikovat *Lawsonia intracellularis* ve fekálních vzorcích z klinicky postižených prasat ale postrádá citlivost k identifikaci postižených jedinců (Collins, 2013).

2.7 Ekonomické dopady Ileitidy

Klinický dopad infekce *L. intracellularis* závisí na dávce bakterií přijatých prasaty, na expresi genů bakteriální virulence, stimulaci hostitelského imunitního systému a faktorů životního prostředí. Potrava prasat, genetika, imunitní odpověď a střevní mikroflóra mohou mít vliv na závažnost onemocnění (Collins, 2013).

Klinické příznaky ileitidy, včetně průjmů jsou zřejmé po dobu jednoho až tří týdnů, což snižuje účinnost konverze krmiva (FCE) až o 50 %. Většina prasat se zotaví z klinického onemocnění během čtyř až šesti týdnů ale chronická forma může ovlivnit růst prasat až po dobu deseti týdnů. Snížení průměrného denního přírůstku (ADG) se pohybuje v rozmezí 17 až 84 %. Tyto skutečnosti mohou vést ke zvýšení počtu dní nutných k porážce nebo k navýšení zpětného tuku a nakonec hospodářským ztrátám (Collins, 2013).

Mnoho prasat je postiženo subklinicky, jak dokládá extrémně vysoká prevalence séropozitivních prasat vzhledem k malému podílu prasat s lézemi typickými pro PE. U takových prasat bývá průjem zřídka pozorován, avšak dochází ke snížení průměrného denního přírůstku o 9 až 42 % a snížení FCE o 6 až 37 %. U subklinické formy se během tří týdnů významně sníží příjem krmiva, ale v tom stejném období nedochází ke snížení průměrných denních přírůstků, i když se výrazně zvýší variace váhy prasat. Během tří týdnů po dosažení vrcholu infekce prasata zvýší hmotnost rychleji než v časném infekčním období přičemž svalové přírůstky jsou významně sníženy. To je způsobeno zvýšením P2-zpětného tuku (Collins, 2013).

3 PROLIFERATIVNÍ ENTEROPATIE KONÍ

Proliferativní enteropatie koní (EPE) je přenosné enterické onemocnění hříbat způsobující proliferaci infikovaných enterocytů, což má za následek ztlustění střevního epitelu, nejčastěji tenkého střeva. Akutní klinická forma, spojená s anémií postihuje nejčastěji hříbata po odstavu a způsobuje horečku, letargii, periferní ventrální edém, krvavým průjem, koliky

a ztráty hmotnosti. Inkubační doba onemocnění u koní se předpokládá dva až tři týdny (Lavoie *et al.*, 2000; Pusterla *et al.*, 2013).

Diagnóza EPE bývá stejně náročná jako v případě prasat a spoléhá se na přítomnost hypoproteinémie, která bývá použita jako rychlá screeningová metoda, ztlustění segmentů stěny tenkého střeva pozorované na abdominální ultrasonografii, pozitivní sérologii a molekulární detekci *L. intracellularis* ve výkalech (Dauvillier *et al.*, 2006; Lavoie *et al.*, 2000; Pusterla *et al.*, 2013). Jsou dány fenotypové a genomové rysy a profily genové exprese při infekci *L. intracellularis* (Dauvillier *et al.*, 2006; Pusterla *et al.*, 2013).

3.1 Etiologie

Lawsonia intracellularis je také etiologickým původcem střevního onemocnění u koní nazývaného equinní proliferativní enteropatie. Stejně jako u prasat napadá střevní enterocyty, což vede k zesílení tenkého a někdy i tlustého střeva. Vrchol infekce nastává pět až sedm dní po vystavení hříběte infekční dávky *Lawsonia intracellularis* (Lavoie *et al.*, 2000).

Proliferační enteropatie koní byla poprvé hlášena v roce 1982 na severoamerickém kontinentě. Od roku 1996 bylo popsáno několik případů o sporadickém výskytu a ohniscích na chovných farmách. V následujících letech bylo čím dál častěji zaznamenáno hlášení EPE vyskytující se především u hříbat po porodu a občas u dospělých koní. Toto onemocnění téměř dosáhlo celosvětového výskytu a bylo hlášeno v USA, Kanadě, Evropě, Jižní Africe, Austrálii, Brazílii a Japonsku (Lavoie *et al.*, 2000; Pusterla *et al.*, 2013).

3.2 Epizootologie

L. intracellularis způsobuje proliferativní enteropatii v širokém rozmezí a rozmanitosti živočišných druhů a to zdůrazňuje potřebu nutnosti univerzálních diagnostických testů, aby porozuměly významu onemocnění u jednotlivých druhů a mohly řešit problematiku dynamiky možného přenosu mezi jednotlivými druhy (Dauvillier *et al.*, 2006; Pusterla *et al.*, 2013).

Zdroj infekce pro koně není jasný, ale předpokládá se přenos orofekální cestou mezi jednotlivými zvířaty umístěnými společně se zvířaty vykazujícími klinické příznaky EPE. U EPE, stejně jako u PPE dochází k asymptomatickému nosičství, které komplikuje ozdravení chovu. U hříbat dochází k vylučování infekční dávky ve výkalech po dobu 10 až 14 dní a u dospělých koní po dobu 17 až 27 dní (Pusterla *et al.*, 2013). Závažnost klinických projevů proliferativní enteropatie u koní závisí na infekční dávce *L. intracellularis* a na stavu

hostitelské imunity (Lavoie *et al.*, 2000). U myší a potkanů bylo prokázáno, že jsou důležitými rezervoáry *L. intracellularis* (Pusterla *et al.*, 2013).

Predisponující faktory jako je stres nebo přeplněné chovy mají za následek úbytek kolostrálních protilátek proti *L. intracellularis* a tím nakažení sajících hříbat kobyloou (Pusterla *et al.*, 2013).

S rostoucím počtem onemocnění dochází ke kontaminaci prostředí a tím šíření infekční dávky *L. intracellularis*. Bakterie je schopná přežít ve vnějším prostředí po dobu dvou týdnů, při teplotě 5 až 15°C (Lavoie *et al.*, 2000; Pusterla *et al.*, 2013).

3.3 Patogeneze

Patogeneze EPE zůstává nedostatečně prozkoumána stejně jako u prasat. Morfologie počátečních lézí naznačuje, že přítomnost intracelulárního organismu a jeho zvýšení počtu přímo předchází hyperplazii enterocytů. Stejně jako rozlišení lézí úzce souvisí se zánikem *L. intracellularis*, což ukazuje na souvztažnost mezi oběma událostmi. *L. intracellularis* jsou umístěny v apikální membráně infikovaných enterocytů a běžně se nacházejí v blízkosti mitochondrií, což naznačuje symbiotickou interakci (Pusterla *et al.*, 2013). Po proniknutí do proximální části tenkého střeva u koně bakterie aktivně proniká do enterocytů intestinálních krypt. Charakteristické ztluštění střevních kluků je dáno progresivní proliferací nezralých epiteliálních buněk (Gebhart *et al.*, 2010). Prostředky, kterými *L. intracellularis* působí hyperplazii nejsou známy. Zánět je faktorem pouze v pozdějších fázích a pro primární léze není charakteristický. Zotavující se hříbata mají určitou imunitu vůči reinfekci, nevykazují klinické příznaky a množství *L. intracellularis* je nedetekovatelné. Buněčně zprostředkovatelná imunitní odpověď se jeví jako důležitý prvek při obraně zvířat před reinfekcí. Imunocytologické testy odhalují mírnou infiltraci T-cytotoxických lymfocytů, makrofágů a B-lymfocytů. Imunohistochemické testy také prokazují, stejně jako u prasat velkou akumulaci IgA v apikální cytoplasmě proliferujících enterocytů a po specifické stimulaci se začíná produkovat interferon gama (Pusterla *et al.*, 2013).

3.4 Klinické příznaky

Existují charakteristické rysy, sezónnost, klinické příznaky a krevní abnormality související s EPE (Pusterla *et al.*, 2013). Je důležité si uvědomit, že klinická forma proliferativní enteropatie koní je limitovaná na mladší věkové kategorie (sající hříbata a zejména odstavčata). Většina popsaných případů infekce *Lawsonia intracellularis* u koní jsou ojedinělé případy. Pouze vyjimečně dochází k infekci u více hříbat na jedné chovné farmě.

Věk postižených zvířat se pohybuje od 3 do 13 měsíců, ale nejrizikovější skupinou jsou hříbata před odstavem ve věku 4 až 7 měsíců (Lavoie *et al.*, 2000). Jiná než věková predispozice nebyla u koní prokázána. V severní Americe je toto onemocnění často pozorováno mezi srpnem a lednem (Pusterla *et al.*, 2013).

Mezi nejčastější klinické nálezy u postižených hříbat patří letargie, anorexie, dehydratace, horečka (>38,5 °C), periferní edém (na ventrální straně, pochvě, hrdle a na distálních končetinách), ztráta hmotnosti, průjem a kolika (rekurentní abdominální bolesti) (Pusterla *et al.*, 2013). Úbytek hmotnosti je markantní a nastává v průběhu několika dní od prvních projevů klinického onemocnění (Lavoie *et al.*, 2000). Časně klinické příznaky jsou obecně nespecifické a zahrnují mírnou skleslost, částečnou anorexiu a horečku. I když je průjem, který může být intermitentní a různé intenzity běžně pozorován u postižených hříbat, některá postižená hříbata mohou mít normální výkaly (Pusterla *et al.*, 2013). Příznaky koliky se liší od mírných, přerušovaných epizod až po akutní, nekontrolované případy (Lavoie *et al.*, 2000). Hříbata s EPE mohou trpět přidruženými potížemi jako jsou infekce dýchacích cest, žaludeční vředy a střevní parazitismus (Pusterla *et al.*, 2013).

Podobně jako u prasat může mít onemocnění subklinický průběh. Subklinické onemocnění je charakterizováno samovolným snížením celkové koncentrace sérových proteinů ve spojení se sníženým denním přírůstkem hmotnosti ve srovnání s nenakaženými hříbaty (Pusterla *et al.*, 2013). V závažných případech ústí ke vzniku koagulopatie až diseminované intravaskulární koagulopatie (Lavoie *et al.*, 2000). Nejvíce charakteristické laboratorní parametry pro EPE tedy zůstávají sérologické hodnoty hypoproteinemie způsobená hypoalbuminemií. Celkový protein je obecně nižší než 5,0 g/dl a albumin je obvykle nižší než 2,0 g/dl. Přesné mechanismy, kterými se hypoalbuminémie vyvíjí dosud nebyly zjištěny. Zdá se, že to může být způsobeno kombinací sníženého příjmu krmiva spolu s malabsorpcí a enteropatií bílkovin (Bihar, 2003). Hypoproteinémie hříbat s PE je výsledkem ztráty intestinálních proteinů a malabsorbce aminokyselin. Zvýšený proteinový katabolismus přispívá k hypoproteinemii zvířat (Lavoie *et al.*, 2000).

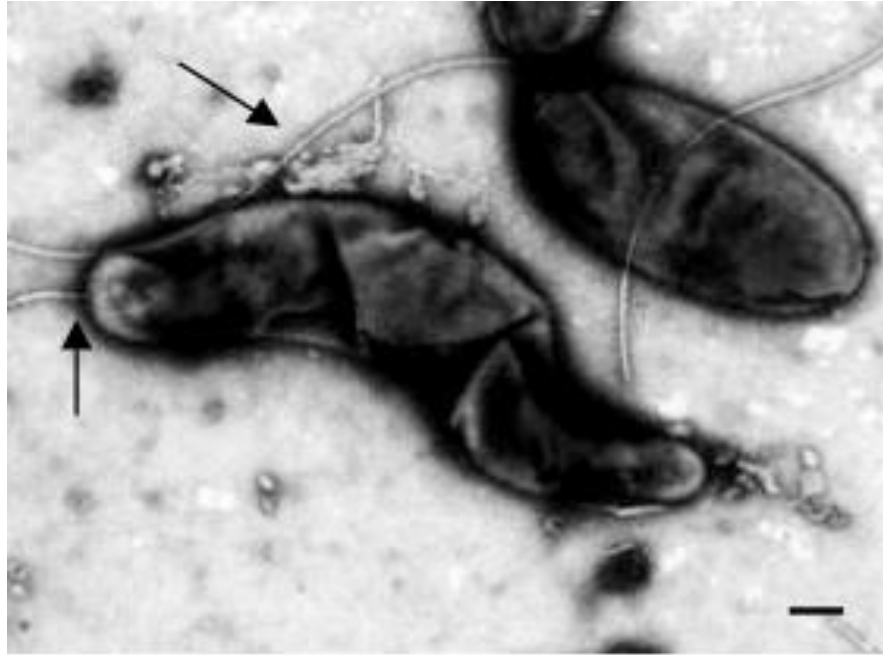
Postižená hříbata také mohou prokazovat nespecifické krevní abnormality jako je anémie nebo leukocytóza, neutropenie, hyperfibrinogenemie, hyperlipemie, zvýšená koncentrace kreatinkinázy v plazmě, poruchy acidobazické rovnováhy a elektrolytové abnormality (hypokalcemie, hypochloremie, hyponatremie) (Pusterla *et al.*, 2013). Při vyšetření kostní dřeně je přítomna hypoplazie erythroidní linie (Lavoie *et al.*, 2000).

Je třeba upozornit na skutečnost, že proliferativní enteropatie koní je potencionálně fatální onemocnění s variabilní délkou průběhu. Postižená hříbata mohou přejít do chronické formy, kdy přetrvává intermitentní průjem, ke zhoršení kvality srsti a přidruženým sekundárním infekcím. U chronických případů dochází v důsledku chronického zánětu k mírné anémii (Lavoie *et al.*, 2000).

Proliferativní enteropatie u koní je charakteristická patoanatomickým nálezem v tenkém střevě. Léze jsou nejčastěji pozorovány v ileu a v blízkosti ileocekálního spoje a objevují se jako ztlustění sliznice. Sliznice tenkého střeva je výrazně girifikovaná. Duodenální léze lze nalézt zřídka. Hrubé léze nejsou patrné ve všech případech EPE a mohou být často přehlédnuty. Střevo vykazuje nepravidelný, patrný subserózní edém. Střevní sliznice je zesílena hlubokými záhyby a chronicky postižená zvířata mohou vykazovat patrné pseudomembrány pokrývající sliznici. Hypertrofie a ztlustění svalové vrstvy se vyskytuje o chronické formy a u zvířat s reinfekcí (Lavoie *et al.*, 2000).

Histologicky dochází k proliferaci adenomatóz mezi epiteliální buňky v kryptech enterocytů ve spojení s přítomností zakřivených intracelulárních bakterií v apikální cytoplasmě těchto enterocytů. Závažné případy PE jsou diagnostikovány průkaznou hyperplázií buněk krypt se zvýšeným počtem mitoticky se dělících buněk a výraznou redukcí Panethových a pohárkových buněk. Histopatologické léze jsou jedinečné a zánět se obvykle neobjevuje (Pusterla *et al.*, 2013).

Ultrastrukturálně, pomocí rutinní transmitní elektronové mikroskopie obsahuje cytoplazma krypt enterocytů postižených *L.intracellularis* četné, mírně zakřivené bakteriální tyčinky mající vlnitou, vícevrstvou buněčnou stěnu a husté cytoplazmatické granule mající průměr 0,3 μ m a délku až 2,1 μ m, jak je vidět na Obrázku 4 (Lavoie *et al.*, 2000; Pusterla *et al.*, 2013).



Obrázek 4-Elektronová mikroskopie *Lawsonia intracellularis* v čistých kulturách. Šipky poukazují na bičík. (Kroll, J. and J. M. Roof, J.Hoffman, 2006)

Je třeba mít na paměti, že příznaky EPE mohou připomínat příznaky jiných gastrointestinálních poruch. Klinické příznaky doprovázející proliferativní enteropatii u hříbat jsou v počátcích zaměnitelné za běžná intestinální onemocnění (akutní ileitida tenkých střev, střevní obstrukce, ulcerace, závažné parazitózy, akumulace písku, intoxikace rostlinami) nebo za určité bakteriální infekce (*Clostridium* spp., *Salmonella* spp., *Rhodococcus equi*, *Neorickettsia risticii*, *Rotavirus*, *Coronavirus*). Serologicky zjištěná hypoproteinémie zahrnuje do diferenciální diagnózy i další možné příčiny jako je malnutrice, hepatopatie, renální onemocnění a krvácení (Lavoie *et al.*, 2000; Pusterla *et al.*, 2013).

3.5 Diagnostika

Předpokládaná diagnostika EPE se obvykle provádí na základě věku postiženého zvířete, klinických příznaků, detekci hypoproteinémie/hypoalbuminémie a vyloučení diferenciálních příčin enteropatie. Ultrasonografické vyšetření dutiny břišní, i když není příliš citlivé, může u postižených hříbat odhalit ztlustělé kličky tenkého střeva a případné zmnožení peritoneální tekutiny v důsledku hypoproteinémie a peritoneálního dráždění. V případech onemocnění způsobených *L. intracellularis* bude peritoneální tekutina bez zánětu. U postižených kliček tenkého střeva dochází ke ztrátě diferenciace vrstvy sliznice a vrstvy podslizniční a tím na ultrasonografii vzniká znatelný obraz (Nuss *et al.*, 2002b).

Posmrtná diagnóza je obecně potvrzena sérologickým vyšetřením nebo detekcí bakterie *L.intracellularis* pomocí PCR ve výkalech. Variabilní citlivost diagnostických testů závisí na situaci a proto je nezbytné kombinovat jak molekulární, tak sérologické testy (Dauvillier *et al.*, 2006; Pusterla *et al.*, 2009a).

Pozitivita sérologického vyšetření je zřejmá do několika dní od nástupu klinických příznaků onemocnění, avšak cirkulující protilátky se v séru objevují minimálně půl roku, což znesnadňuje interpretaci výsledků. Falešně negativní sérologické výsledky lze očekávat v počáteční fázi onemocnění, když humorální imunita ještě není dostatečně silná, aby byla testy zachycena. Srovnávací studie jednotlivých sérologických testů, včetně IFAT, ELISA a IPMA prokázaly, že u koní je imunoperoxidázový monovrstevný test při určování přítomnosti anti-*L.intracellularis* protilátky nejvíce specifický (Gebhart *et al.*, 2012).

Diagnostiku PCR je nutné provést před začátkem antimikrobiální léčby a na počátku detekce infekce. Neboť v pokročilém stádiu onemocnění a při léčení antibiotiky se již ve výkalech neočekává přítomnost *L.intracellularis*. Je třeba si uvědomit, že metoda PCR detekuje i neživé mikroorganismy. Jako nejúčinnější metoda byla prokázána real-time PCR, poskytující nejlepší citlivost a nejmenší možnost přenosu onemocnění (Pusterla *et al.*, 2008). Při diagnostice je třeba přihlížet k faktu, že vzhledem k možnosti asymptomatického průběhu onemocnění EPE lze PCR pozitivitu ve výkalech a pozitivní výsledek sérologického vyšetření získat i od klinicky zdravých jedinců (Pusterla *et al.*, 2013).

Další diagnostická metoda představuje histologické vyšetření z odebrané živé tkáně z postižených úseků tenkého střeva při laparotomii (Lavoie *et al.*, 2000).

3.6 Léčba

Léčba EPE u koní zahrnuje použití antimikrobiálních látek, jako jsou makrolidy, samotné nebo v kombinaci s deoxycyklinem (100 ppm) či oxytetracyklinem (180ppm) podávané po dobu 2-3 týdnů (Pusterla *et al.*, 2013). Vzhledem k intracelulární povaze bakterie je nutné použít antimikrobiálních preparátů na základě dostupné antimikrobiální citlivosti bakterie, farmakodynamiky léčiv a rychlé klinické odpovědi přípravu (Lavoie *et al.*, 2000; Pusterla *et al.*, 2013). Při výběru antimikrobiální látky při léčbě EPE by mělo být zohledněno riziko vyvolání poruchy gastrointestinální flóry a renální toxicity. To je obzvláště problém při léčbě starších hříbat s těžkou hypoalbuminemií (Schumacher *et al.*, 2000). Dále lze využít léčby využívané pro rodokokovou infekci (erytromycin 250 ppm v kombinaci s rifampicinem 100ppm podávaného po dobu minimálně tří týdnů) (Hackett *et al.*, 2014; Sampieri *et al.*,

2006). Erytromycin a rifampicin dobře pronikají buněčnou membránou a jsou používány přednostně pro léčbu intracelulárních bakterií, jako je *L.intracellularis* (Lavoie *et al.*, 2000).

Kromě toho je u většiny hříbat postižených proliferativní enteropatií nezbytná podpůrná léčba, například podání intravenózní tekutiny. Těžká hypoproteinémie je indikací k podání plazmatických transfuzí. Dehydratovaní jedinci vyžadují parentální výživu a rehydrataci. Vzhledem k riziku závažnosti celkového onemocnění a postižení určité věkové skupiny koní je součástí léčby podávání antiulcerózních léků (Slovis, 2016).

Důležité je ošetření postižených zvířat zavčasu, předtím, než se charakteristické léze EPE stihnou plně rozvinout, tím dojde k výrazné ztrátě hmotnosti a sérologickým nálezům kriticky nízkých hodnot sérových proteinů. Odpověď zvířat na léčebný postup představuje nepřímé potvrzení diagnózy (Lavoie *et al.*, 2000; Pusterla *et al.*, 2013).

Po včasném stanovení diagnózy a včasném nasazení léčby lze očekávat rychlé klinické zlepšení. Může však trvat několik týdnů, než dojde k vymizení hypoproteinémie v séru jedince. Postižená hříbata reagující na aplikovanou léčbu mají dobrou prognózu pro ozdravení z nemoci (Pusterla *et al.*, 2013).

3.7 Monitoring a prevence

Včasné rozpoznání klinických případů, izolace postižených koní od ostatních vnímavých jedinců až do úplného ozdravení nebo ukončení vylučování *L.intracellularis* výkaly a dezinfekce kontaminovaného prostředí je základním preventivním opatřením v chovech s průkazem zavlečení infekce (Pusterla *et al.*, 2013).

Pravidelný monitoring stád s průkazem klinického případu infekce *Lawsonia intracellularis* zahrnuje fyzické hodnocení zdraví hříbat, měsíční nebo dvouměsíční hodnocení celkové koncentrace sérových proteinů a měsíční hodnocení sérologického stavu (Pusterla *et al.*, 2013).

Dále zachování dobré ochrany proti škůdcům a zabránění tomu, aby domácí a volně žijící zvířata získala přístup ke krmným místům hříbat může potencionálně minimalizovat riziko šíření nákazy (Pusterla *et al.*, 2013).

Strategie prevence byly nejlépe popsány u prasečí proliferativní enteropatie pomocí antimikrobiálních premixů a komerčně dostupné vakcíny proti *L. intracellularis* (Guedes *et al.*, 2003a). Ukázalo se, že vakcína vyráběná pro prasata je velmi dobře snášena i hříbaty. Hříbě po vakcinaci udrží vyšší denní přírůstky hmotnosti a vyšší celkové koncentrace

sérových proteinů. Načasování podání antimikrobiální léčby a vakcíny by mělo být synchronizováno s výskytem prvních onemocnění ve stádě. V neposlední řadě se doporučuje rutinní sledování klinických příznaků a hypoproteinémie/ hypoalbuminémie i při profylaxi očkování (Kroll *et al.*, 2004; McOrist *et al.*, 2007).

4 ZÁVĚR

Ve své bakalářské práci jsem se snažila seznámit s konkrétními problémy komplikující identifikaci, vývoj a léčbu této obligátně intracelulární bakterie *Lawsonia intracellularis*. Chtěla jsem poukázat na aktuální problematiku veterinární oblasti, kterou řeší nejen veterinární pracovníci.

Lawsonia intracellularis nejen svým jedinečným způsobem života v cytoplasmě, ale i schopností modulovat imunitní reakci komplikuje včasnou detekci onemocnění. A proto infekce velmi často přecházejí do chronické formy onemocnění. Diagnostické metody musí být vylepšené, citlivější s možností zaznamenat i malé množství infekční dávky *L.intracellularis*.

V první části bakalářské práce jsem popsala samotné taxonomické zařazení bakterie, patogenezi a diagnostiku. U klinicky nemocných jedinců postižených *L. intracellularis* je léčba problematická. To je způsobeno nedostatečnou a včasnou možností onemocnění diagnostikovat a nedostatečně včasnou reakcí zvíře léčit. Diagnostické metody se neustále vyvíjejí, proto je pro lepší diagnostikování a léčbu infekce způsobených *L.intracellularis* potřeba zavádět a používat v klinické praxi propracovanější imunologické metody a moderní molekulárně biologické metody. To přináší značnou úlevu pro hospodáře, protože díky propracovanějším diagnostickým metodám lze čím dál tím více monitorovat PE bez použití antibiotik. A to snižuje ekonomické náklady onemocnění.

Druhá část bakalářské práce se zabývá onemocněním způsobeným *L.intracellularis*. Popsala jsem nejen formy onemocnění ale i možnosti léčby. Jako největší komplikace se zde jeví subklinicky nakažení jedinci, kteří jsou asymptomatictí a dochází tak k snadnému šíření infekce. Tyto jedince není snadné detekovat. Doporučuje se preventivní přeléčení nově nakoupených zvířat a pravidelné monitorování. U akutní formy klinické příznaky bývají spíše všeobecné a mohou být často zaměněny za celou řadu jiných infekcí.

Úspěšnost zvládnutí infekce zcela závisí na pravidelném monitoringu. Znalost patogeneze *L.intracellularis* umožňuje rozvíjet postupy hygieny a biologické bezpečnosti. Hospodáři by se měli zaměřit na pravidelné sérologické vyšetření ve svých chovech. Vakcinace živou vakcínou zajistí, že všechna zvířata jsou vystavena působení dávky *L. intracellularis* a budou chráněna před klinickými příznaky onemocnění.

5 POUŽITÁ LITERATURA

- Bakker, J.; Van Der Heijden, H. M. J. F.; De Smet, M.; Vos, J. (2000): Comparison Of Laboratory Techniques For The Diagnosis Of Porcine Proliferative Enteropathy (PPE) In Fattening Pigs. IPVS, 16 Th , Melbourne (Proceedings Of The 16 Th Congress Of The International Pig Veterinary Society, Melbourne, September 2000), 25 (Alimentary).
- Bane, D., B. Norby, I. Gardner, M. Roof, J. P. Knittel, E. Bush, and C. J. Gebhart, 1998: The epidemiology of porcine proliferative enteropathy. In: Done S.H. (ed.), Proceedings of the 15th IPVS Congress, Birmingham, UK, pp. 107. Nottingham University Press, Nottingham.
- Beister, H. E., and L. H. Schwartz. 1931. Intestinal adenoma in swine. *Am. J. Pathol.* 7:175-185.
- Bihl, T.P., 2003. Protein-losing enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis* in a weanling foal. *Can. Vet. J.* 44, 65–66.
- Boesen, H. T.; Jensen, T. K.; Moller, K.; Nielsen, L.H. And Jungersen, G. (2005): Evaluation Of A Novel Enzyme-Linked Immunosorbent Assay For Serological Diagnosis Of Porcine Proliferative Enteropathy. *Veterinary Microbiology* 109, No. 1 – 2, 105 – 112.
- Class, M.; Bilkei, G. (2004): Seroprevalence Of Antibodies Against *Lawsonia Intracellularis* Among Growing Pigs Raised In Indoor Versus Outdoor Units. *JAVMA* 225 (12), 1905–1907.
- Collins A. Advances in Ileitis Control, Diagnosis, Epidemiology and the economic Impacts of Disease in Commercial Pig Herds. *Agriculture* 2013; 3: 536-555.
- Collins, A. M. (2000): A Study Of The *Lawsonia Intracellularis*-Induced Porcine Proliferative Enteropathies (Part I–IV). Dissertation / Thesis, 1 – 232 (I – Xiii).
- Collins, A. M., Love, R. J., Jasni, S. and McOrist, S. (1999). Attempted infection of mice, rats and chickens by porcine strains of *Lawsonia intracellularis*. *Australian Veterinary Journal*, 77, 120–122.
- Collins, A. M.; Dijk, M.; Vu, N. Q.; Pozo, J. And Love, R. J. (2001): Immunity To *Lawsonia Intracellularis*. Proceedings Of The 2001 Allen D. Lemman Conference, 115 – 120.
- Collins, A.M. And Colleagues (2000): Enteric Diseases – *Lawsonia Proliferative Enteropathy (Ileitis)* And E.Coli-Strategic Medication And Development Of Immunity To *Lawsonia Intracellularis*. IPVS, 16 Th , Melbourne (Proceedings Of The 16 Th Congress Of The International Pig Veterinary Society, Melbourne, September 2000), 22–25.

- Connor, J. F. 1991. Diagnosis, treatment, and prevention of porcine proliferative enteritis. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.* 13:1172-1176.
- Cooper, D. M. and Gebhart, C. J. (1998). Comparative aspects of proliferative enteritis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 212, 1446–1451.
- Dauvillier, J., Picandet, V., Harel, J., Gottschalk, M., Desrosiers, R., Jean, D., Lavoie, J.P., 2006. Diagnostic and epidemiological features of *Lawsonia intracellularis* enteropathy in 2 foals. *Can. Vet. J.* 47, 689–691.
- Fellstroem, C.; Jacobson, M.; Zimmerman, U.; Gunnarsson, A. (2002): Screening For *Brachyspira* SPP And *Lawsonia Intracellularis* In European Wild Pigs. IPVS, 17 Th , Ames (Proceedings Of The 17 Th Congress Of The International Pig Veterinary Society, Ames, 2002) Paper 367.
- Gebhart CJ, Guedes RMC. *Lawsonia intracellularis*. In: Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO, eds. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. 4th ed. Ames, IA: Blackwell; 2010:503–509.
- Gebhart, C.J., Barnes, SM., McOrist, S., Lin, G.F., and Lawson, G.H.K., 1993. *Heal Symbion Intracellularis*. an obligate intracellular bacterium of porcine intestines showing a relationship to *Desulphovibrio* species. *Int.J.Syst.Bacteriol.*, 43: 533-538.
- Gebhart, C.J., Page, A.E., Kelley, M., Chander, Y., Mapes, S., White, A., Horohov, D.W., Pusterla, N., 2012. Comparative study of serology assays for equine proliferative enteropathy. *Proc. Am. Assoc. Equine Pract.* 58, 503.
- Guedes R. Update on epidemiology and diagnosis of porcine proliferative enteropathy. *J Swine Health Prod.* 2004;12(3):134-138.
- Guedes RMC, Gebhart CJ, Deen J, Winkelman NL. Validation of an immunoperoxidase monolayer assay as a serologic test for porcine proliferative enteropathy. *J Vet Diag Invest.* 2002;14:528–530.
- Guedes RMC, Gebhart CJ, Winkelman NL, Mackie-Nuss RA. A comparative study of an indirect fluorescent antibody test and an immunoperoxidase monolayer assay for the diagnosis of porcine proliferative enteropathy. *J Vet Diag Invest.* 2002;14:420– 423.
- Guedes, R.M., Gebhart, C.J., 2003a. Onset and duration of fecal shedding, cell-mediated and humoral immune responses in pigs after challenge with a pathogenic isolate or attenuated vaccine strain of *Lawsonia intracellularis*. *Vet. Microbiol.* 91, 35–145.
- Guedes, R.M.C.; Gebhart, C.J. (2003): Onset And Duration Of Fecal Shedding, Cell-Mediated And Humoral Immune Responses In Pigs After Challenge With A Pathogenic

- Isolate Or Attenuated Vaccine Strain Of *Lawsonia Intracellularis*. *Veterinary Microbiology* 91, 135–145.
- Gyles, C.L.; Prescott, J.F.; Songer, J.G.; Thoen, C.O. (Ed.): *Pathogenesis Of Bacterial Infections In Animals*, 3 Rd Ed. Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa.
- Hackett, E. S., Divers, T. J. & Orsini, J. A. (2014) Appendix 9. Equine emergency drugs: approximate dosages and adverse drug reactions. In *Equine Emergencies. Treatments and Procedures*. 4th edn. Eds J. A. Orsini, T. J. Divers. Saunders Elsevier. pp 835-860
- Hardge, T.; Keller, C.; Steinheuer, R.; Tessier, Ph.; Salleras, J.-M.; Rubio, P.; Vestergaard, K.; Cluydts, G.; (2006): Serological Prevalence Of *Lawsonia Intracellularis* Across European Pig Herds. *Proceedings Of The 19 Th International Pig Veterinary Society Congress*, Copenhagen, Denmark.
- Hardge, T.; Nickoll, E.; Grunert, H.; Elbers, K.; Langbein, U.; Keller, C.; Bleier, T.; Pohlenz, J.; Ohlinger, V.F.; Schroeder, B. (2004): Prevention Of Porcine Proliferative Enteropathy (PPE) By Vaccination – Efficacy And Economics In European Farms. *Pig Journal (Pig J)* 54, 17–34.
- Haugegaard, J.; Szancer, J.; Hansen, K.K.; Ripley, P.; Fisch, R. (2000): Evaluation Of The Efficacy Of Econor® (Valnemulin) In The Treatment Of A Naturally-Occurring Outbreak Of Porcine Proliferative Enteropathy (PPE) (Ileitis) In Denmark. *IPVS, 16 Th , Melbourne (Proceedings Of The 16 Th Congress Of The International Pig Veterinary Society, Melbourne, September 2000)*, 76 (Alimentary).
- Jacobson, M. (2003). *Enteric diseases in pigs from weaning to slaughter*, ISSN 1401-6257, ISBN 91-576-6387-4. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- Jacobson, M., Aspan, A., Heldtander Königsson, M., Hård af Segerstad, C., Wallgren, P., Fellström, C., Jensen-Waern, M., Gunnarsson, A., 2004. Routine diagnostics of *Lawsonia intracellularis* performed by PCR, serological and post mortem examination, with special emphasis on sample preparation methods for PCR. *Veterinary Microbiology* 102, 189–201.
- Karuppanan, Anbu K.; 2018
- Karuppanan, Anbu K.; Opriessnig, Tanja. *Lawsonia intracellularis: Revisiting the Disease Ecology and Control of This Fastidious Pathogen in Pigs*. *Frontiers in veterinary science*, 2018, 5.
- Kiernan, J. A. Silver staining for spirochetes in tissues: rationale, difficulties, and troubleshooting. *Laboratory Medicine*. 2002, 33, stránky 705-708.

- Kroll, J. and J. M. Roof, J.Hoffman, 2006
- Kroll, J.J., Roof, M.B., Hoffman, L.J., Dickson, J.S., Harris, D.L., 2005. Proliferative enteropathy: a global enteric disease of pigs caused by *Lawsonia intracellularis*, *Animal Health. Res. Rev.* 6, 173-197.
- Kroll, J.J., Roof, M.B., McOrist, S., 2004. Evaluation of protective immunity in pigs following oral administration of an avirulent live vaccine of *Lawsonia intracellularis*. *Am. J. Vet. Res.* 65, 559–565.
- La, T.; Collins, A. M.; Philips, N. D.; Oksa, A.; Hampson, D. J. (2004): Evaluation Of A Multiplex-PCR For The Detection Of *Brachyspira Hyodysenteriae*, *Brachyspira Pilosicoli* And *Lawsonia Intracellularis* In Pig Faeces. IPVS, 18 Th , Hamburg (Proceedings Of The 18 Th Congress Of The International Pig Veterinary Society, Hamburg, 2004) 1, 283.
- Lavoie, J.P., Drolet, R., Parsons, D., Leguillet, R., Sauvageau, R., Shapiro, J., Houle, L., Halle, G., Gebhart, C.J., 2000. Equine proliferative enteropathy: a cause of weight loss, colic, diarrhoea and hypoproteinemia in foals on three breeding farms in Canada. *Equine Vet. J.* 32, 418–425.
- Lawson G.H.K., McOrist S. The enigma of the proliferative enteropathies: a review. *J Comp Pathol* 1993;108:41–46.
- Lawson, G.H.K. and Gebhart, C.J. (2000) Proliferative enteropathy. *Journal of Comparative Pathology* 122, 77±100.
- Lawson, G.H.K., McOrist, S., Rowland, A.C., McCartney, E., Roberts, L., 1988. Serological diagnosis of the porcine proliferative enteropathies: Implications for aetiology and epidemiology. *Veterinary Record* 122, 554–557.
- McClintock SA, Collins AM. *Lawsonia intracellularis* proliferative enteropathy in a weanling foal in Australia. *Aust Vet J* 2004; 82:750–752.
- McOrist, S., Gebhart, C.J., Boid, R., Barns, S.M., 1995. Characterization of *Lawsonia intracellularis* gen. nov., sp. nov., the obligatory intracellular bacterium of porcine proliferative enteropathy. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 820–825.
- McOrist, S., Mackie, R. A. M. and Lawson, G. H. K. Guimardes, E. B. (1985). Clinical and pathological (1995c). Antimicrobial sensitivity of ileal symbiont in- diagnosis of spontaneous proliferative haemorrhagic *tracellularis* isolated from pigs with proliferative enter- enteropathy in swine. *Arquivo Brasileiro de Medicina opathy. Journal of Clinical Microbiology*, 33, 1314–1317.
- McOrist, S., Smits, R.J., 2007. Field evaluation of an oral attenuated *Lawsonia intracellularis* vaccine for porcine proliferative enteropathy (ileitis). *Vet. Rec.* 161, 26–28.

Mølbak L, Johnsen K, Boye M, et al. The microbiota of pigs influenced by diet texture and severity of *Lawsonia intracellularis* infection. *Vet Microbiol.* 2008;128(1–2):96–107.

Moulder (1985), Finlay and Falkow (1989)

Nuss, R. A., Marsteller, T. A. & Deen, J. (2002b) Comparison of different methods for diagnosis of porcine proliferative enteropathy. *Canadian Journal of Veterinary Research* 66, 99-107.

Paradis, M. A.; Pauling, G. E.; Brennan, J.; Winkelman, N. L.; Bagg, R. N.; Dick, C. P.; Wilson, J. (2004): Evaluation Of Tylosin Tartrate In Drinking Water For Treatment Of Porcine Proliferative Enteropathy (Ileitis). *Journal Of Swine Health And Production* 12 (4), 176 – 181.

Pearson, H. (2012). Understanding and mitigating the risk of pathogen transmission from wild animals to domestic pigs in Australia. PhD Thesis, Farm Animal & Veterinary Public Health, Camden, University of Sydney, Australia.

Pozo, J.; Vidal, A. B.; De Arriba, M. L.; Carvajal, A.; Gutierrez, A.; Rubio, P. (2002): Study Of *Lawsonia Intracellularis* Infection In Breeding Stock And Suckling Piglets. IPVS, 17 Th , Ames (Proceedings Of The 17 Th Congress Of The International Pig Veterinary Society, Ames, 2002), Paper 380.

Prieto C, Pineiro C, Aparicio M. Seroprevalence of *L. intracellularis* in different production systems. *Proc IPVS.* Ames, Iowa. 2002:218.

Pusterla N, Gebhart C., *Lawsonia intracellularis* infection and proliferative enteropathy in foals. *Vet Microbiol* 2013: 167:34-41

Pusterla, N., Jackson, R., Wilson, R., Collier, J., Mapes, S., Gebhart, C., 2009a. Temporal detection of *Lawsonia intracellularis* using serology and realtime PCR in Thoroughbred horses residing on a farm endemic for equine proliferative enteropathy. *Vet. Microbiol.* 136, 173–176.

Pusterla, N., Mapes, S., Rejmanek, D., Gebhart, C., 2008. Detection of *Lawsonia intracellularis* by real-time PCR in the feces of free-living animals from equine farms with documented occurrence of equine proliferative enteropathy. *J. Wildl. Dis.* 44, 992–998.

Sampieri, F., Hinchcliff, K.W., Toribio, R.E., 2006. Tetracycline therapy of *Lawsonia intracellularis* enteropathy in foals. *Equine Vet. J.* 38, 89–92.

Schumacher, J., Schumacher, J., Rolsma, M., Brock, K.V., Gebhart, C.J., 2000. Surgical and medical treatment of an Arabian filly with proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. *J. Vet. Intern. Med.* 14, 630–632.

- Slovis, Nathan. (2016). Management of equine proliferative enteropathy. In Practice. 38. 287-292. 10.1136/inp.i2797.
- Smith, D.G. and Lawson, G.H. (2001) *Lawsonia intracellularis*: getting inside the pathogenesis of proliferative enteropathy. Vet. Microbiol., 82, 331--345.
- The Pig Site: The PigSite guide to Ileitis Technical Manual 3.0 [online]. [cit. 2018-11-06]. Dostupné z: <http://www.thepigsite.com/publications/2/ileitis/129/41-what-forms-of-ileitis-are-known/>
- Vannucci FA, Gebhart CJ (2014) Recent advances in understanding the pathogenesis of *Lawsonia intracellularis* infections. Veterinary Pathology, 51, 465e477.
- Veterinary Pathology: Proliferative Ileitis in a pig [online]. [cit. 2018-11-06]. Dostupné z: <https://vetpath.wordpress.com/2008/08/01/proliferative-ileitis-in-a-pig-lawsonia-intracellularis/>
- Williams, n. m., Harrison, L. R. and Gebhart, C. J. (1996). Proliferative enteropathy in a foal caused by *Lawsonia intracellularis*-like bakterium. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 8, 254-256.
- Yates WD, Clark EG, Osborne AD; Proliferative hemorrhagic enteropathy in swine: an outbreak and review of the literature. Can Vet J 20; 261-268, 1979.
- Žižlavský, M., Bartoš, M. Ekonomicky nejzávažnější onemocnění gastrointestinálního traktu výkrmových prasat. SEVARON s.r.o. [online]. 1999 [cit. 2006-03-14], s.1-4. Dostupný z WWW: < <http://www.agris.cz/clanek/127922/ekonomicky-nejzavaznejsi-onemocneni-gastrointestinalniho-traktu-vykrmovych-prasat>>