



# Zaključno poročilo o rezultatih raziskovalnega projekta

Zadnja sprememba: 13. 08. 2022 13:36:40

## A. Podatki o raziskovalnem projektu

### 1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra in naziv	V4-1805 - Možnosti obvladovanja paratuberkuloze v rejah krav molznic in dvig konkurenčnosti slovenske govedoreje
Vodja	11133 - Matjaž Ocepek
Naziv težišča v okviru CRP	1.2.3 - Možnosti obvladovanja paratuberkuloze v rejah krav molznic in dvig konkurenčnosti slovenske govedoreje
Obseg učinkovitih ur raziskovalnega dela	1155
Cenovna kategorija	C
Obdobje trajanja	od 1. 11. 2018 do 31. 10. 2021
Nosilna raziskovalna organizacija	406 - Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	481 - Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta
Raziskovalno področje po šifrantu ARRS	4 - Biotehnika 4.04 - Veterina 4.04.02 - Animalna patologija in epizootiologija
Družbeno-ekonomski cilj	08 - Kmetijstvo
Raziskovalno področje po šifrantu FORD	4 - Kmetijske vede 4.03 - Veterina

### 2. Sofinancerji

Naziv, naslov in pooblaščen predstavnik sofinancerja(Name, address and beneficiary-authorized representative) Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano

Matična številka(Co. reg. no.) Dunajska cesta 22, Ljubljana

DODAJ

## B. Rezultati in dosežki raziskovalnega projekta

### 3. Povzetek raziskovalnega projekta

SLO

V okviru projekta smo izvedli statično in časovno analizo omrežja premikov govedi in preučili njihov vpliv na širjenje povzročitelja med rejami. Naši rezultati kažejo, da analiza omrežja premikov govedi lahko pripomore k optimizaciji spremljanja in obvladovanja paratuberkuloze v Sloveniji. Z upoštevanjem danih predpostavk in negotovosti je bilo ocenjeno, da je splošno tveganje za izpostavljenost MAP preko mleka in mlečnih izdelkov za slovenskega potrošnika majhno. S programom @RISK, verzija 7.6.1 smo na podlagi pridobljenih podatkov pripravili osnovni bio-ekonomski model mlečne črede, ki se nadgrajuje z vplivi paratuberkuloze na proizvodnjo. Ker je vpliv paratuberkuloze pri klinično in subklinično obolelih živalih različen, smo na ravni živali uvedli tri podmodele. Metodo qPCR, ki temelji na pomnoževanju gena F57, smo validirali in umerili z digitalnim PCR. Ugotovljeni mejni detekcije (300 MAP/g) in mejni kvantifikacije (892 MAP/g fecesa), kažeta na dobre lastnosti testa. Prevalenco paratuberkuloze smo ugotavljali v rejah bikovskih mater črne bele pasme. V letu 2019 je bilo pregledanih 188 skupinskih vzorcev blata odvzetih v 89 rejah, 4 (4,49%) reje so bile pozitivne, v letu 2020/21 pa 246 vzorcev odvzetih v 118 rejah, 5 (4,24%) rej je bilo pozitivnih. Obakrat je bilo pregledanih 84 rej, 6 (7,14%) jih je bilo vsaj v enem letu pozitivnih. Podrobno smo pregledali 11 od 12 pozitivnih rej – tri so bile odkrite ob preliminarnem vzorčenju. Na osnovi oglada farme smo podali priporočila za omejevanje nadaljnjih okužb v reji. Odvzeli smo vzorce blata in krvi vsem živalim starejših od dveh let, vzorce vode in skupinski vzorci mleka. Skupaj smo tako pregledali 1015 živali, 28 vzorcev vode in 7 vzorcev mleka. Pozitivnih je bilo 191 vzorcev blata živali iz 10 farm, povprečna prevalenca v rejah je bila 13,6 %. Pozitivnih je bilo tudi 8 vzorcev vode. Vsaj en vzorec vode je bil pozitiven v 4 rejah, medtem ko so bili vsi vzorci mleka negativni. Povprečna seroprevalenca v rejah - test ELISA, je bila 7,1 %. Biokemija – pri 188 živalih (v vsaki reji smo izbrali pare krav okužena – zdrava, ki so bile v enaki fazi laktacije in enako stare ter so imele enako mlečnost) smo izmerili sposobnost vezave železa (TIBC), vsebnost vitamina D3 in skupno antioksidantno kapaciteto (TAS) v krvnem serumu. Pri zdravih kravah smo ugotovili statistično značilno višjo vrednost TAS v primerjavi z okuženimi. Ugotovili smo statistično značilno pozitivno korelacijo med preiskovanimi biokemijskimi parametri in vrednostjo PCR ct. Pri živalih, ki izločajo več bakterij (MAP) se rezultati preiskovanih biokemijskih parametrov slabšajo, kar pripisujemo vplivom bolezni. S podrobno analizo premikov govedi v in iz 11 pozitivnih rej, smo identificirali 45 gospodarstev, ki imajo višje tveganje za prisotnost paratuberkuloze. Na osnovi vseh rezultatov smo pripravili predlog pravilnika o pogojih za priznanje, pridobitev in vzdrževanje statusa črede, proste paratuberkuloze.

### 4. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela oz. ciljev raziskovalnega projekta

V prvem letu smo vsi partnerji na projektu pripravili vprašalnik za rejce in plan vzorčenja, ter pričeli s preliminarnim vzorčenjem v reji kjer so posamezne krave kazale klinične znake paratuberkuloze. Rejcem smo po opravljenih preiskavah svetovali ukrepe za nadzor bolezni. Članica

projektne skupine Marija Klopčič je na Oddelku za zootehniko na Rodici organizirala strokovna predavanja na temo »Izzivi za slovenske kmetije«, v sklopu katerih smo predstavili problematiko paratuberkuloze ter delo, ki ga nameravamo opraviti v okviru projekta. Povzetek dogajanja je bil objavljen v časopisu Kmečki glas. Pripravljen vprašalnik smo predstavili Upravnemu in Nadzornemu odboru priznane rejske organizacije za črno-beló pasmo, ki nanj ni imel pripomb.

Izvedli smo statično in časovno analizo omrežja premikov govedu in preučili njihov vpliv na širjenje povzročitelja med rejami. V analizo smo vključili podatke od 1. 8. 2011 do 31. 7. 2016, ki smo jih pridobili iz UVHVVR. Vozišča v omrežju predstavljajo gospodarstva različnega tipa, povezava pa premik vsaj ene živali iz enega vozišča v drugo. Mesečna in letna statična omrežja smo generirali in analizirali s programom Pajek in paketom Igraph v programskem jeziku R. Model širjenja MAP smo pripravili v programskem jeziku Python. Skupno je bilo v premike govedu vključenih 37.138 gospodarstev. Posamezno govedo je bilo v premiku do 28-krat; večina (97,4 %) do trikrat. Več kot polovica vseh premikov je ustvarila neposreden stik med kmetijskimi gospodarstvi, skoraj tretjina pa je šla skozi zbirne centre. V mesečnih omrežjih je bil očiten sezonski vzorec premikov, kar je posledica pašne dobe. V letnih omrežjih je zgornjih 30 % gospodarstev opravilo 80 % vseh premikov. Simulacija ciljne odbire gospodarstev je pokazala, da se disociacija omrežja bistveno izboljša, ko vozišča izločamo glede na vrednosti lokalnih mer in ko uporabimo nedavne podatke. Z modeliranjem širjenja MAP na časovnem omrežju smo zajeli vzročno dostopnost gospodarstev. Razviti SI (ang. Susceptible-Infectious) model vključuje štiri scenarije verjetnosti prenosa; 0,02 - najboljši, 0,15 - srednji, 0,25 - ocenjeni in 0,40 - najslabši scenarij. V nobenem od scenarijev okužba ni dosegla nasičenosti. Najvišje stopnje v dnevni incidenci smo opazili na koncu pašnega obdobja. Rezultati kažejo na uporabnost podatkov o premikih govedu za izvajanje ciljnih nadzornih ukrepov, saj lahko določimo, katera gospodarstva predstavljajo večje tveganje za vnos ali širjenje bolezni.

Izdelavo ocene ekonomskega vpliva paratuberkuloze smo pričeli z zbiranjem natančnih podatkov o strukturi kmetijskih gospodarstev, odkupljenih količin in cen mleka, proizvodnji mleka in mlečnih izdelkov v Sloveniji za zadnja dostopna leta. Podatke smo pridobili iz Kmetijskega inštituta Slovenije, Gospodarske zbornice Slovenije, Agencije RS za kmetijske trge in razvoj podeželja, Statističnega urada RS ter Evropskega statističnega urada. S programom @RISK, verzija 7.6.1 smo na podlagi pridobljenih podatkov pripravili osnovni bio-ekonomski model mlečne črede. Model, ki povzema značilnosti mlečne črede v Sloveniji, sedaj nadgrajujemo z vplivi paratuberkuloze na proizvodnjo. Te podatke smo zbrali iz objavljenih člankov in poročil iz drugih držav in zajemajo: vpliv paratuberkuloze na proizvodnjo mleka, zmanjšano telesno maso živali, predčasno izločanje živali iz reje, povečano smrtnost, zmanjšano reprodukcijsko sposobnost živali in povečano dovzetnost za druge bolezni. Ker je vpliv paratuberkuloze pri klinično in subklinično obolelih živalih različen, smo na ravni živali uvedli tri podmodele. Tako se vpliv na ravni črede sešteje glede na simulirano število zdravih živali ter klinično in subklinično obolelih živali.

Poleg tega smo v model vključili tudi podatke o neposrednem izločanju MAP v mleko in o posredni kontaminaciji mleka s kontaminiranimi iztrebki, kar bo omogočilo oceno zmanjšanja izpostavljenosti ljudi MAP ob uvedbi v tem projektu predvidenih ukrepov.

V spomladanskih mesecih leta 2020 zaradi ukrepov v zvezi s Covid 19 nismo mogli vzorčiti v vseh pozitivnih rejah. Se je pa v tem času intenzivno delalo na dokončanju doktorske disertacije »Celovita kvantitativna ocena tveganja za prisotnost Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis v mleku in mlečnih izdelkih«. V njenem okvirju je bilo ocenjeno tveganje za izpostavljenost MAP preko mleka in mlečnih izdelkov za slovenskega potrošnika. Izvedena je bila kvantitativna ocena tveganja kjer je bilo zaradi pomanjkanja empiričnih podatkov potrebno uporabiti modeliranje. Z namenom ocenjevanja prevalenca je bil razvit razredni model za preučevanje širjenja MAP znotraj črede in model širjenja MAP med čredami na časovnem omrežju. Pridobljeni rezultati so bili uporabljeni v stohastičnem modelu za kvantitativno oceno izpostavljenosti.

Razredni model je pokazal podobno razširjenost MAP znotraj črede, kot so ocenile predhodne raziskave v Sloveniji. Rezultati kažejo, da je za proučevanje širjenja MAP v čredah različnih velikosti potrebno uporabiti različne modele. V nalogi je tudi predstavljena prva poglobljena analiza kompleksnega omrežja premikov goveda v Sloveniji. Uporabljeni pristop modeliranja širjenja MAP med čredami z razredčenimi omrežji se lahko uporabi tudi za modeliranje drugih poti prenosa bolezni in tudi za druge bolezni. Naši rezultati kažejo, da bi analiza omrežja premikov govedu lahko pripomogla k optimizaciji spremljanja in obvladovanja paratuberkuloze v Sloveniji. Z upoštevanjem danih predpostavk in negotovosti je bilo ocenjeno, da je splošno tveganje za izpostavljenost MAP preko mleka in mlečnih izdelkov za slovenskega potrošnika majhno. Za ljudi, ki uživajo surovo mleko in surove mlečne izdelke s kmetij s paratuberkulozo, je tveganje visoko. Medtem ko je tveganje za izpostavljenost preko pasteuriziranega mleka v maloprodaji in preko drugega predelanega mleka najverjetneje zanemarljivo.

V času prekinitive vzorčenja zaradi pandemije smo metodo qPCR, ki je bila vpeljana za ugotavljanje prisotnosti MAP v preiskovanih vzorcih in temelji na pomnoževanju gena F57, validirali in umerili z digitalnim PCR. Za ta namen smo pripravili 5-kratno redčitveno vrsto DNA izolirane iz MAP-pozitivnega fecesa goveda, v treh bioloških replikatih. Vsak replikat smo s PCR analizirali v treh tehničnih replikatih, kvantificirali pa smo ga tudi z dPCR, da smo pridobljene vrednosti testa qPCR lahko prevedli v število MAP na g fecesa, saj se gen F57 vedno pojavlja v eni kopiji na genom MAP. Za test qPCR smo ugotovili mejo detekcije 300 MAP/g in mejo kvantifikacije 892 MAP/g fecesa, kar kaže na dobre lastnosti testa. Umerjeni test qPCR bo omogočal zasneljivo štetje MAP v preiskovanih vzorcih fecesa po predhodni izolaciji DNA.

Spomladi leta 2021 smo zaključili z drugim odvzemom skupinskih vzorcev blata. V letu 2019 je bilo pregledanih 188 skupinskih vzorcev blata odvzetih v 89 rejah, v letu 2020/21 pa 246 vzorcev odvzetih v 118 rejah. Skupno je bilo tako v dveh letih pregledanih 412 skupinskih vzorcev blata, odvzetih v 207 rejah. Dvakrat je bilo pregledanih 84 rej. V rejah, ki so bile pozitivne v letu 2019, razen ene izjeme (na željo lastnika), v letu 2020 nismo jemali skupinskih vzorcev, ampak so bile pregledane vse živali v reji. Rezultate prikazujemo v spodnji tabeli:

letno število rej pozitivne %

2019 89 4 4,49

2020 118 5 4,24

Skupaj 207 9 4,35

2x vzorčene 84 6 7,14

Pri 2x vzorčenih se za pozitivne štejejo reje, ki so bile v obeh letih vsaj enkrat pozitivne, zato je odstotek pozitivnih rej nekoliko višji.

Podrobno smo pregledali 11 od 12 pozitivnih rej. En rejec (od devetih) je zavrnil sodelovanje, smo pa zato pregledali še tri druge, pri preliminarnem vzorčenju odkrite, pozitivne reje krav molznic. V vsaki reji smo najprej na osnovi ogleda farme, podali priporočila za omejevanje nadaljnjih okužb. Nato smo odvzeli vzorce blata in krvi vsem živalim starejših od dveh let, vzorce vode in bazenske vzorce mleka. Skupaj smo tako pregledali 1015 živali, 28 vzorcev vode in 7 vzorcev mleka. Pozitivnih je bilo 191 vzorcev blata živali iz 10 rej, povprečna prevalenca v rejah je bila 13,6 %. Pozitivnih je bilo tudi 8 vzorcev vode. Vsaj en vzorec vode je bil pozitiven v 4 rejah, medtem ko so bili vsi vzorci mleka negativni. Na 6 farmah smo s testom ELISA našli tudi živali s protitelesi proti MAP, povprečna seroprevalenca v rejah je bila 7,1 %.

Biokemija – v vsaki reji smo izbrali pare krav za primerjavo med okuženimi in zdravimi. V pare smo vključili primerljive krave iz posamezne reje, ki so bile v enaki fazi laktacije in enako stare ter so bile izenačene glede dnevne količine mleka v časovno najbližji mlečni kontroli. V krvnem serumu smo izmerili vsebnost vitamina D3 (VIDAS® 25 OH Vitamin D Total assay) ter sposobnost vezave železa (TIBC), in skupno antioksidantno kapaciteto (TAS) z avtomatskim analizatorjem RX Daytona+. Ugotoviti želimo ali imajo živali, ki kljub izpostavljenosti povzročitelju niso obolele, vrednosti izbranih parametrov drugačne od obolelih. Zanima nas tudi vpliv okužbe, ki največje spremembe povzroča v črevesju, na parametre v krvi, ki so indirektno povezani tudi z ustreznim delovanjem črevesja. V statistično analizo rezultatov smo vključili samo pare krav črno-bele pasme (150 krav). Podatki o izbranih parih živali so prikazani v spodnji tabeli.

Krave Pozitivne (n=75) Negativne (n=75)

Zaporedna laktacija 2,5 (1-8) 2,35 (1-6)

Dni v laktaciji 212 (11-607) 209 (23-761)

Prireja mleka (kg)/dan 29,1 (9.2-52.4) 29,7 (10.3-50.4)

Pri zdravih kravah smo ugotovili statistično značilno višjo vrednost TAS v primerjavi z okuženimi, vrednosti vitamina D3 in TIBC pa se nista statistično značilno razlikovali med skupinama. Ugotovili smo statistično značilno pozitivno korelacijo med koncentracijo Vitamina D3 in vrednostjo PCR ct ( $p=0,003$ ), med vrednostjo TIBC in PCR ct ( $p=0,01$ ) ter med vrednostjo TAS in PCR ct ( $p=0,001$ ). Naše ugotovitve kažejo, da se pri živalih, ki izločajo več bakterij (MAP) rezultati preiskovanih biokemijskih parametrov slabšajo, kar pripisujemo vplivom bolezni. Rezultati biokemijskih preiskav pri okuženih in zdravih živalih (srednja vrednost, min. in maks. vrednost) so v spodnji tabeli.

Parameter Pozitivne (n=75) Negativne (n=75)

Vitamin D3 (ng/mL) 20,94 (8,2-39,2) 21,52 (11,8-34,5)

TIBC (µg/dl) 328,5 (178,5-428,1) 325,9 (193,7-419,6)

TAS (mmol/L) 1,11 (0,57-1,5) 1,17 (0,73-1,56)

Za podrobno analizo premikov govedu in iz 11 pozitivnih rej, smo pridobili podatke o vseh premikih govedu v Sloveniji med 1. 1. 2006 in 20. 5. 2021. Ker so nas zanimali premiki, ki so epidemiološko pomembni za širjenje bolezni, smo izločili vse premike na končna gospodarstva (klavnice, zbiralnice trupel, ipd.). Vsa pozitivna gospodarstva so bila del močno povezane komponente (v celotnem obdobju, kot tudi v letnih omrežjih) in so

beležila več premikov in večje število sosedov (25–291 stopenj) od povprečnega gospodarstva, ki je imelo 17,82 stopenj. Šest pozitivnih gospodarstev je živali premaknilo na in iz razstave ali sejma, samo eno gospodarstvo je imelo neposreden stik s planinskim pašnikom; in sicer so v rejo pripeljali dve živali iz dveh različnih planinskih pašnikov. Pozitivna gospodarstva so za nadaljnjo rejo več živali prodala kot kupila, pri čemer so kupovali samo od nekaj gospodarstev, prodajali pa precej večjemu številu različnih. Podrobno smo analizirali gospodarstva s katerimi so v zadnjih 10 letih opravili pet ali več premikov živali; povezanih gospodarstev je bilo skupno 263. 30 od teh gospodarstev je bilo v stiku z dvema ali več pozitivnimi rejami, s katerimi so imeli v premiku od 10 do nekaj tisoč živali. Na podlagi števila premikov, števila živali v premiku ter velikosti in strukture čred na povezanih gospodarstvih, smo identificirali 45 gospodarstev, ki imajo višje tveganje za prisotnost paratuberkuloze. Na osnovi vseh rezultatov smo pripravili predlog pravilnika o pogojih za priznanje, pridobitev in vzdrževanje statusa črede, proste paratuberkuloze (Johnejeve bolezni) pri govedu.

## 5. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem projektu in zastavljenih raziskovalnih ciljev

Realizirali smo večino planiranega programa projekta. Zaradi izrednih razmer smo morali, posamezne dele nekoliko prilagoditi, oziroma zmanjšati, smo pa na drugi strani razširili raziskave na področju, ki ni bil odvisen od neposrednega kontakta z rejci. Tako smo na primer dodali validacijo qPCR, Del analiz se nam je zaradi bolezni (Covid19) v projektni skupini in težav pri vzpostavitvi kontaktov na terenu, nekoliko zavlekel. Posledično še niso bile pregledane vse reje, kjer smo ugotovili povečano tveganje za okužbo, vendar s preiskavami nadaljujemo. Dodatno smo tekom projekta ugotovili, da je podrobna ekonomska analiza vpliva paratuberkuloze izredno kompleksna in zahteva več časa in sredstev kot jih je bilo v okviru CRPa na voljo. V okviru projekta smo tako izdelali osnovni ekonomski model reje in izvedli osnovne analize vplivov paratuberkuloze na ekonomičnost reje. Bolj podrobne analize pa bodo opravljene v okviru temeljnega projekta J4-3093 Paratuberkuloza pri mlečnem govedu, pomen skupnih pašnikov, ekonomska analiza in vključevanje deležnikov, ki ga s pomočjo rezultatov tega projekta, izvajamo skupaj z raziskovalno skupino iz Švice.

## 6. Spremembe programa dela raziskovalnega projekta oziroma spremembe sestave projektne skupine

V letu 2020 smo iz projektne skupine izključili raziskovalko Matejo Pate (24612), zaradi zamrznitve/suspenza delovnega razmerja. Mlada raziskovalka Tanja Knific (38142), pa je septembra uspešno zaključila doktorski študij in se na Veterinarski fakulteti zaposlila kot raziskovalka ter tako nadaljevala z delom na projektu.

## 7. Najpomembnejši dosežki projektne skupine na raziskovalnem področju

Naslov (Title) SLO

Modeliranje prenosa paratuberkuloze v majhni čredi krav molznic, značilni za Slovenijo, nakazuje, da bi bilo treba za preučevanje širjenja bolezni v čredah različnih velikosti uporabiti različne modele

Naslov (Title) EN

Modeling paratuberculosis transmission in a small dairy herd typical of Slovenia suggests that different models should be used to study disease spread in herds of different sizes

Opis (Description) SLO

Namen te raziskave je bil oceniti dinamiko paratuberkuloze v tipični slovenski čredi krav molznic, ki šteje približno 17 krav. To je prva študija, ki je preučila dinamiko širjenja bolezni v majhni čredi krav molznic. Rezultati kažejo, da je prevalenca paratuberkuloze manjša kot v večjih čredah in da trgovina z živalmi pomembno vpliva na obstojnost bolezni v čredi. Rezultati kažejo, da je treba za preučevanje širjenja in nadzora te bolezni v čredah različnih velikosti uporabiti različne modele.

Opis (Description) EN

The aim of this study was to evaluate the dynamics of paratuberculosis in a typical Slovenian dairy herd of about 17 cows. This is the first study specifically looking at the dynamics of disease spread in a small dairy herd. The results show that the prevalence of paratuberculosis is lower than in larger herds and that animal trade has an important influence on the persistence of the disease in a herd. The results suggest that different models should be used to study the spread and control of this disease in herds of different sizes.

Objavljeno v (Published in)

MDPI AG; Animals; 2022; Vol. 12, iss. 9; art. 1150, 1-18 str.; Impact Factor: 2.752; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.731; A<sup>+</sup>: 1; WoS: ZC, AD; Avtorji/Authors: Knific Tanja, Kirbiš Andrej, Gethmann Jörn Martin, Prezelj-Perman Jasna, Krt Branko, Ocepek Matjaž;

COBISS ID

106391555

Leto

2022

Tipologija (Tipology)

1.01 - Izvirni znanstveni članek (Original Scientific Article)

Naslov (Title) SLO

Kvantitativna ocena tveganja izpostavljenosti Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP) preko različnih vrst mleka za slovenskega potrošnika

Naslov (Title) EN

Quantitative risk assessment of exposure to Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP) via different types of milk for the Slovenian consumer

Opis (Description) SLO

Prispevek je predstavil stohastični model za kvantitativno oceno tveganja z uporabo simulacij Monte Carlo. Ocenjeno je bilo tveganje za izpostavljenost slovenskega potrošnika bakteriji MAP preko surovega, pasteriziranega in UVT mleka. Skupno tveganje je bilo ocenjeno kot nizko, razen za ljudi, ki uživajo surovo mleko s kmetij, pozitivnih na MAP. Z večjo razširjenostjo paratuberkuloze bi se povečalo tudi tveganje. Da bi preprečili morebiten preplah za javno zdravje in zaščitili preživetje kmetov, si je treba prizadevati za zmanjšanje razširjenosti paratuberkuloze.

Opis (Description) EN

This paper presented a stochastic model for quantitative risk assessment using Monte Carlo simulations. The risk of exposure to MAP via raw, pasteurized and UHT milk for the Slovenian consumer was estimated. The overall risk was estimated to be low, except for people consuming raw milk from MAP positive farms. However, with a higher prevalence of paratuberculosis, the risk would also increase. In order to prevent a potential public health scare and to safeguard farmers' livelihoods, a reduction in paratuberculosis prevalence should be aimed for.

Objavljeno v (Published in)

MDPI; Foods; 2022; Vol. 11, iss. 10; art. 1472, str. 1-20; Impact Factor: 4.350; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.240; A<sup>+</sup>: 1; A<sup>+</sup>: 1; WoS: JY; Avtorji/Authors: Knific Tanja, Ocepek Matjaž, Kirbiš Andrej, Krt Branko, Prezelj-Perman Jasna, Gethmann Jörn Martin;

COBISS ID

108463619

Leto

2022

Tipologija (Tipology)

1.01 - Izvirni znanstveni članek (Original Scientific Article)

Naslov (Title) SLO

Kontrola paratuberkuloze: kdo, zakaj in kako: pregled programov v 48 državah

Naslov (Title) EN

Control of paratuberculosis: who, why and how

Opis (Description) SLO

Prispevek opisuje kje in kakšni so programi nadzora paratuberkuloze v obdobju 2012–2018 v državah, za katere obstajajo zanesljivi podatki. Ocenjuje tudi utemeljitev kontrolnih programov in rezultate preteklih in sedanjih programov nadzora ter predstavi priporočila za prihodnje nadzorne programe.

Opis (Description) EN

The paper describes the existence and nature of control programs for paratuberculosis for the period 2012-2018 in countries for which there is reliable information. It also assesses the rationale for control programs and the outcome of past and current control programs, and presents recommendations for future control programs.

Objavljeno v (Published in)

BioMed Central.; BMC veterinary research; 2019; Vol. 15, art. no. 198; str. 1-29; Impact Factor: 1.835; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.331; A: 1; WoS: ZC; Avtorji/Authors: Whittington Richard, Donat Karsten, Weber Maarten F., Kelton David, Nielsen Søren Saxmose, Eisenberg Suzanne, Arrigoni Norma, Juste Ramon A., Sáez Jose Luis, Dhand Navneet, Ocepek Matjaž;

COBISS ID

4833402

Leto

2019

Tipologija (Tipology)

1.02 - Pregledni znanstveni članek (Review Article)

Naslov (Title) SLO

Posledice trgovine z govedom za širjenje in nadzor nalezljivih bolezni v Sloveniji

Naslov (Title) EN

Implications of cattle trade for the spread and control of infectious diseases in Slovenia

Opis (Description) SLO

V prispevku je predstavljena prva poglobljena analiza kompleksnega omrežja trgovine z govedom v Sloveniji. Podrobno so preučene značilnosti mesečnih in letnih statičnih omrežij ter ocenjena uporabnost globalnih in lokalnih mer omrežja za izvajanje ciljnih kontrolnih ukrepov. V drugem delu predstavlja potencialno širjenje paratuberkuloze med čredami goveda v Sloveniji s t.i. SI modelom (ang. Susceptible-Infectious; dovzetjen-inficiran) na časovnem omrežju.

Opis (Description) EN

The paper presents the first in-depth analysis of the Slovenian cattle trade characterized as a complex network. It explores monthly and yearly static networks in detail as well as assesses the usefulness of global and local network measures for targeted control measures. In the second part, it presents the SI (Susceptible-Infectious) model on the temporal network of possible paratuberculosis spread between cattle herds in Slovenia.

Objavljeno v (Published in)

Frontiers Media S.A.; Frontiers in veterinary science; 2020; Vol. 6, art. 454; str. 1-17; Impact Factor: 3.412; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.731; A: 1; WoS: ZC; Avtorji/Authors: Knific Tanja, Ocepek Matjaž, Kirbiš Andrej, Lentz Hartmut H.K.;

COBISS ID

4931450

Leto

2020

Tipologija (Tipology)

1.01 - Izvirni znanstveni članek (Original Scientific Article)

Naslov (Title) SLO

Pregled kontrolnih programov za bolezni goveda, ki so razvrščene v kategorije C, D ali E novega zakona o zdravju živali v Evropi

Naslov (Title) EN

Overview of cattle diseases listed under category C, D or E in the animal health law for which control programmes are in place within Europe

Opis (Description) SLO

Evropska Unija predpisuje način kontrole posebno nevarnih kužnih bolezni, ki jih je uvrstila v kategorijo A ali B novega zakona o zdravju živali. Za kontrolo ostalih bolezni se lahko države same odločajo ali in kako bodo vršile kontrolo nad njimi. Nas cilj je bil povzeti informacije o kontrolnih programih in epidemiološke statusu držav za kužne bolezni goved. Članek nudi pregled 23 kužnih bolezni goveda za katere obstaja kontrolni program vsaj v eni evropski državi. V povprečju so imele države 6 kontrolnih programov. Bolezni z največ kontrolnimi programi so bile Enzootska goveja levkoza, Bolezen modrikastega jezika, IBR, BVD in Vrnični prisad. Ostale bolezni so kontrolirane s strani redkih ali le samo ene države. Kontrola bolezni goveda v Evropi je zelo heterogena, kar otežuje primerjavo med državami.

Opis (Description) EN

The European Union prescribes the control of particularly dangerous infectious diseases, which are listed under category A or B of the new animal health law. For the other disease, each country can decide if and how they will control these diseases. The aim was to provide an overview of the control programmes and country disease statuses for infectious cattle diseases. This paper provides an overview of 23 infectious cattle diseases for which a control programme exists at least in one European country. On average countries had 6 control programmes. The diseases with the most control programmes were Enzootic bovine leukosis, bluetongue, IBR, BVD and anthrax. Other diseases are controlled by only a few or just a single country. The control of cattle diseases is very heterogenous in Europe which makes the comparison between different countries very difficult.

Objavljeno v (Published in)

Frontiers Media S.A.; Frontiers in veterinary science; 2021; Vol. 8; art. no. 688078, str. 1-13; Impact Factor: 3.412; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.731; A: 1; WoS: ZC; Avtorji/Authors: Hodnik Jaka Jakob, Acinger Rogić Žaklin, Alishani Mentor, Autio Tiina, Balseiro Ana, Berezowski John, Carmo Luis Pedro, Chaligiannis Ilias, Conrady Beate, Costa Lina, Ježek Jožica, Knific Tanja, Ocepek Matjaž, Starič Jože, Toplak Ivan;

COBISS ID

71941379

Leto

2021

Tipologija (Tipology)

1.01 - Izvirni znanstveni članek (Original Scientific Article)

## 8. Najpomembnejši dosežek projektne skupine na področju gospodarstva, družbenih in kulturnih dejavnost

Naslov (Title) SLO

Celovita kvantitativna ocena tveganja za prisotnost Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis v mleku in mlečnih izdelkih

Naslov (Title) EN

Comprehensive quantitative risk assessment on the presence of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in milk and milk products

Opis (Description) SLO

V doktorski nalogi je bila izvedena prva poglobljena analiza kompleksnega omrežja premikov goveda v Sloveniji. Uporabljeni pristop modeliranja širjenja MAP med čredami z razredčenimi omrežji se prav tako lahko uporabi za modeliranje drugih poti prenosa bolezni med čredami in tudi

drugih boleznih. Rezultati kažejo, da bi analiza omrežja premikov govedih lahko pripomogla k optimizaciji spremljanja in obvladovanja nalezljivih boleznih govedih v Sloveniji. Kandidatka je razvila tudi prvi stohastični razredni model, ki je zasnovan posebej za majhno čredo krav molznic. Predstavljeni model lahko služi tudi za preizkušanje učinkovitosti različnih kontrolnih ukrepov. Rezultati pa so lahko uporabni tudi za druge države, ki imajo podobno strukturo mlečnih gospodarstev. Poleg tega je kandidatka razvila tudi stohastični model za kvantitativno oceno tveganja s simulacijami Monte Carlo za izpostavljenost ljudi bakteriji MAP v Sloveniji. Predstavljeni rezultati bi lahko nudili podporo za informirano odločanje o intervencijskih ukrepih za nadzor MAP v Sloveniji.

Opis (Description) EN

The dissertation is the first to analyze in detail the complex network of cattle movements in Slovenia. The approach used to model the spread of MAP between herds with diluted networks can also be used to model other pathways of disease transmission between herds as well as for other diseases. The results show that the analysis of the cattle movement network could help to optimize the surveillance and control of infectious diseases in Slovenia. The candidate also developed the first stochastic compartmental model specifically for a small dairy herd. The present model can also be used to test the effectiveness of different control measures. The results may also be useful for other countries with a similar structure of dairy farms. In addition, the candidate developed a stochastic risk assessment model with Monte Carlo simulations for human exposure to MAP in Slovenia. The presented results could provide support for informed decision making for MAP intervention measures in Slovenia.

Objavljeno v (Published in)

[T. Knific]; 2020; 100 str.; Avtorji/Authors: Knific Tanja;

Šifra

A.07 - doktorat

COBISS ID

30486275

Leto

2020

Tipologija (Typology)

2.08 - Doktorska disertacija (Doctoral Dissertation)

Naslov (Title) SLO

Paratuberkuloza pri govedu

Naslov (Title) EN

Paratuberculosis in cattle

Opis (Description) SLO

V prispevku je predstavljena paratuberkuloza, povzročitelj bolezni, razširjenost, način okužbe in kako se okužba vnese v rejo. Opisana je patogeneza, potek bolezni in klinični znaki. Predstavljene so diagnostične metode in načini obvladovanja bolezni. Opisane so tudi razmere glede paratuberkuloze v Sloveniji.

Opis (Description) EN

The paper presents paratuberculosis, the pathogen (MAP), prevalence, spreading of infection and how the infection is introduced into herd. The pathogenesis, course of the disease and clinical signs are described. Diagnostic methods and methods of disease control are presented. The situation regarding paratuberculosis in Slovenia is also described.

Objavljeno v (Published in)

Veterinarska zbornica; 2019; Str. 34-39; Avtorji/Authors: Starič Jože, Hodnik Jaka Jakob, Pate Mateja, Ježek Jožica, Očepek Matjaž;

Šifra

COBISS ID

4888442

Leto

2019

Tipologija (Typology)

1.09 - Objavljeni strokovni prispevek na konferenci (Published Professional Paper)

Naslov (Title) SLO

Vpliv okužbe z *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* na izbrane biokemijske krvne parametre

Naslov (Title) EN

The influence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection on selected biochemical blood parameters

Opis (Description) SLO

Cilj študije je bil primerjava vrednosti 25-hidroksivitamina D (25(OH)D), skupnega antioksidantnega statusa (TAS), skupne sposobnosti vezave železa (TIBC), železa in saturacije transferina (TS) med *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) pozitivnimi in negativnimi kravami. Dodatno smo preučili tudi povezavo med MAP pozitivnostjo s PCR in ELISA na te vrednosti in dnevno količino proizvedenega mleka. V študijo smo vključili MAP pozitivne krave (n=75) in njihove negativne pare izenačene glede na zaporedno laktacijo, dnevno količino proizvedenega mleka in število dni v laktaciji iz 9 kmetij. Samo TAS je bil signifikantno različen med MAP pozitivnimi in negativnimi kravami. Vendar so bili vsi parametri razen TS in železa nižji v odvisnosti od koliko pozitivne so bile krave. 25(OH)D je bil povezan z PCR cycle threshold (ct) in je kazal tendenco povezave z ELISA razmerjem med vzorcem in pozitivno kontrolo (S/P). TIBC, TAS, TS in dnevna produkcija mleka so bili povezani z PCR ct in ELISA S/P. Za vsak dodaten 0,1 ELISA S/P so krave dnevno proizvedle 0,55 kg manj mleka in za vsak nižji PCR ct je dnevna produkcija padla za 1,1 kg. Če povzamemo, pozitivnost na MAP vpliva na metabolizem vitamina D, železa in antioksidantov. Podatki iz te študije bi lahko uporabili za lažje prepričevanje kmetov za izločitev pozitivnih živali, ker se jim lahko izgube predstavi na nivoju posamezne živali.

Opis (Description) EN

The aim of the study was to compare 25-Hydroxyvitamin D (25(OH)D), total antioxidant status (TAS), total iron binding capacity (TIBC), iron and transferrin saturation (TS) between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) positive and negative cows. Additionally, we investigated the correlation of PCR and ELISA MAP positivity to these parameters and daily milk yield. MAP positive cows (n=75) and their negative pairs matched for lactation number, daily milk yield and days in milk from 9 farms were included in the study. Only TAS was significantly different between MAP positive and negative cows. However, all parameters except TS and iron were lower the more MAP positive the cows were. 25(OH)D was correlated with PCR cycle threshold (ct) and tended to be correlated with ELISA sample-to-positive (S/P) ration. TAS, TIBC, TS and daily milk yield were correlated with both ELISA S/P and PCR ct. For each 0.1 increase in ELISA S/P the daily milk production would drop by 0.55 kg and for each reduction in PCR ct the yield would decrease by 1.1 kg. In conclusion, MAP positivity affects vitamin D, iron and antioxidant metabolism in infected cows. The data from this study could be used to more easily convince farmers to cull positive animals as the losses can be presented in a more direct, animal specific way.

Objavljeno v (Published in)

ICPD; 2022; Str. 4; Avtorji/Authors: Hodnik Jaka Jakob, Zajc Urška, Ježek Jožica, Očepek Matjaž, Knific Tanja, Starič Jože;

Šifra

COBISS ID

113876739

Leto

2022

Tipologija (Typology)

1.12 - Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci (Published Abstract)

Naslov (Title) SLO

Urednik, članstvo v uredniškem odboru

Naslov (Title) EN

Editor, member of the editorial board

Opis (Description) SLO

Ocepek M: Član uredniškega odbora (2013-) International journal of veterinary medicine 2013- , COBISS.SI-ID 3752570, ISRN Veterinary Science (Online), 2013-, COBISS.SI-ID 3475322], Slovenian veterinary research, 2000-, COBISS.SI-ID 108028416, Veterinarska stanica, 2019-, COBISS.SI-ID 2761730, Starič J: Član uredniškega odbora Journal of Dairy Research 2022-, Macedonian veterinary review 2020- , Veterinarski glasnik 2016-, COBISS.SI-ID 4099842; Tropical Animal Health and Production 2018- , COBISS.SI-ID 26560256, Metabolites. 2022, gostujoči urednik, COBISS.SI-ID 523274009, Veterinarska stanica 2019-, COBISS.SI-ID 2761730, Avberšek J. gostujoči urednik Antibiotics; Klopčič M. urednik: Črnobelo govedo, 2001- , COBISS.SI-ID 29473024, Govedorejski zvonci, 2000- , COBISS.SI-ID 1122860

Opis (Description) EN

Ocepek M: Editorial board member (2013-) International journal of veterinary medicine 2013- , COBISS.SI-ID 3752570, ISRN Veterinary Science (Online), 2013-, COBISS.SI-ID 3475322], Slovenian veterinary research, 2000-, COBISS.SI-ID 108028416, Veterinarska stanica, 2019-, COBISS.SI-ID 2761730; Starič J: Editorial board member Journal of Dairy Research 2022-, Macedonian veterinary review 2020- , Veterinarski glasnik, 2016-, COBISS.SI-ID 4099842; Tropical Animal Health and Production 2018- , COBISS.SI-ID 26560256, Veterinarska stanica, 2019-, COBISS.SI-ID 2761730, guest editor, Metabolites. 2022, COBISS.SI-ID 523274009; Avberšek J. guest editor, Antibiotics; Klopčič M. editor: Črnobelo govedo, 2001- , COBISS.SI-ID 29473024, Govedorejski zvonci, 2000- , COBISS.SI-ID 1122860

Objavljeno v (Published in)

SICRIS

Šifra

C.06 - članstvo v uredniškem odboru

COBISS ID

Leto  
2021

Tipologija (Tipology)

Naslov (Title) SLO

Umeritev in validacija metode PCR

Naslov (Title) EN

Calibration and validation of the PCR method

Opis (Description) SLO

Metodo qPCR, ki je bila vpeljana za ugotavljanje prisotnosti MAP v preiskovanih vzorcih in temelji na pomnoževanju gena F57, smo validirali in umerili z digitalnim PCR (dPCR). Za test qPCR smo ugotovili mejo detekcije (LOD) 300 MAP/g in mejo kvantifikacije (LOQ) 892 MAP/g fecesa, kar kaže na dobre lastnosti testa. Umerjeni test qPCR bo omogočal zanesljivo štetje MAP v preiskovanih vzorcih fecesa po predhodni izolaciji DNA.

Opis (Description) EN

The qPCR method, introduced to determine the presence of MAP in the tested samples and based on the amplification of the F57 gene, was validated and calibrated by digital PCR (dPCR). A limit of detection (LOD) of 300 MAP / g and a limit of quantification (LOQ) of 892 MAP / g faeces were found for the qPCR assay, indicating good test characteristics. A calibrated qPCR test allows a reliable count of MAP in the faecal samples examined after prior DNA isolation.

Objavljeno v (Published in)

Interni dokumenti VF

Šifra

F.07 - Izboljšanje obstoječega izdelka

COBISS ID

Leto  
2020

Tipologija (Tipology)

## 9. Drugi pomembni rezultati projektne skupine

Pet članov projektne skupine sodeluje v mednarodnem projektu COST Action: CA17110 »Standardizing output-based surveillance to control non-regulated diseases of cattle in the EU«, v okviru katerega je med drugimi nereguliranimi boleznimi goved obravnavana tudi paratuberkuloza. Dva člana projektne skupine sodelujeta v mednarodnem projektu COST Action: CA18208 »Novel tools for test evaluation and disease prevalence estimation«, katerega namen je izboljšati in standardizirati ocenjevanje prevalenc z uporabo Bayesovih modelov latentnega razreda, kar bo doprineslo tudi k oceni prevalenc paratuberkuloze v Sloveniji. V času projekta so bili člani projektne skupine mentorji pri sedmih doktoratih in sedmih magisterijih.

## 10. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine

### 10.1. Pomen za razvoj znanosti

SLO

Poleg izboljšave in validacije metode qPCR, ter pridobitve pomembnih epidemioloških podatkov o prevalenci bolezni, tako med čredami, kot znotraj črede, ki so pomembni tudi v mednarodnem merilu, je največji znanstveni doprinos projekta v povezovanju klasičnih epidemioloških pristopov z novjšimi matematičnimi metodami, kar na nacionalni ravni ali v širšem regionalnem okviru ni običajno. Interdisciplinarni pristop, pomaga prepoznati več negotovosti in neznanja ter omogoči boljše sodelovanje in komunikacijo med vsemi deležniki. Rezultati bodo nudili podporo za informirano odločanje o ukrepih za preprečevanje in nadzor paratuberkuloze tako na ravni črede kot na državni ravni, saj bomo kvantitativne epidemiološke in ekonomske ocene opravili v skladu z najnovejšimi znanstvenimi spoznanji. Poleg tega bodo rezultati projekta uporabljeni tudi v okviru COST akcije SOUND-control za mednarodno primerjavo učinkovitosti različnih kontrolnih ukrepov. Posredno bo to doprineslo tudi k novemu zakonu o zdravju živali, saj bodo pripomogli k oblikovanju enotnega splošnega regulatornega okvira za neregulirane kot tudi regulirane bolezni goveda v EU.

ANG

In addition to improving and validating the qPCR method and obtaining important epidemiological data on the prevalence of diseases both between and within herds, which are also important at the international level, the main scientific contribution of the project is the integration of classical epidemiological approaches with newer mathematical methods that are not commonly used at the national level or in a larger regional context. An interdisciplinary approach will help identify more uncertainties and knowledge gaps and enable better collaboration and communication among all stakeholders. The results will support informed decisions on paratuberculosis prevention and control measures at both the herd and national levels through quantitative epidemiological and economic assessments based on the latest scientific evidence. In addition, the results of the project will be used within the framework of the COST action SOUND-control for an international comparison of the effectiveness of various control measures.

Indirectly, this will also contribute to the new Animal Health Law, by facilitating the formation of a single general regulatory framework for unregulated and regulated diseases of cattle in the EU.

## 10.2. Pomen za razvoj Slovenije

SLO

Ker paratuberkuloza sodi med bolezni, ki tako v svetovnem merilu kot tudi pri nas najbolj vplivajo na ekonomičnost velikih rej krav molznic, bodo učinkoviti ukrepi za omejitev bolezni pomembno dvignili konkurenčnost enega najpomembnejših segmentov slovenskega kmetijstva. Poleg tega je bil v okuženih rejah narejen celovit pregled zdravstvenega stanja živali, kar je uporabno tudi pri pripravi morebitnih ukrepov za nadzor drugih bolezni v rejah prežvekovalcev. Z vpeljavo kontrolnih programov in certificiranjem rej lahko pripomoremo tudi k zaščiti slovenske govedoreje pred potencialnimi trgovinskimi zaporami. Bolj ekonomična reja prežvekovalcev pozitivno vpliva na preprečevanje opuščanja reje goveda in drobnice ter s tem zaraščanje travnatih površin in posledično lahko pripomore k zmanjšanju obsega selitev prebivalstva v urbana območja. To bi imelo dolgoročen vpliv na ohranjanje kulturne krajine podeželja, kar je ne nazadnje pomembno tudi z vidika Slovenije kot vse bolj zanimive turistične destinacije. Predlagana raziskava je pomembna tudi zaradi zagotavljanja javnega zdravja. Z izvajanjem kontrolnih ukrepov ne bomo zmanjšali le prevalenco bolezni pri govedu in ekonomskih posledic bolezni, temveč tudi izpostavljenost potrošnikov povzročitelju paratuberkuloze.

ANG

Since paratuberculosis is one of the diseases that has the greatest impact on the profitability of large dairy farms, both globally and in our country, effective measures to control the disease will significantly increase the competitiveness of one of the most important segments of Slovenian agriculture. In addition, a comprehensive survey of the health status of animals was carried out in the infected farms, which is also useful for preparing possible measures to control other diseases in ruminant farms. By introducing control programs and certifying farms, we can also help protect Slovenian cattle breeding from possible trade barriers. More economical rearing of ruminants has a positive effect on preventing the abandonment of cattle and ruminant breeding and thus the overgrowth of grassy areas, and can thus help reduce the migration of the population to urban areas. This would have a long-term impact on the preservation of the cultural landscape in the countryside, which is also important with regard to Slovenia as an increasingly interesting tourist destination. The proposed research is also important for public health. By implementing control measures, we will not only reduce the prevalence of the disease in cattle and the economic consequences of the disease, but also reduce consumer exposure to the paratuberculosis pathogen.

## 11. Vpetost raziskovalnih rezultatov projektne skupine

### 11.1. Vpetost raziskave v domače okolje

Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

v domačih znanstvenih krogih  pri domačih uporabnikih

Kdo (poleg sofinancerjev) že izraža interes po vaših spoznanjih oziroma rezultatih?

Združenja rejcev govedi in posamezni rejci, ter raziskovalci v tujini, ki se ukvarjajo s podobnimi težavami.

### 11.2. Vpetost raziskave v tuje okolje

Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

v mednarodnih znanstvenih krogih  pri mednarodnih uporabnikih

Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujimi raziskovalnimi inštitucijami:

Z raziskovalno skupino iz Švice (Bern) sodelujemo na skupnem projektu, katerega glavni namen je vpeljavo kontrolnih programov v obeh državah. Sodelujemo tudi z raziskovalci iz Italije (Bari). Dva njihova študenta podoktorskega študija sta, oziroma opravljata večmesečno usposabljanje s področja diagnostike paratuberkuloze.

Kateri so rezultati tovrstnega sodelovanja:

Skupne raziskave in izmenjava znanj in izkušenj. V bodoče pa tudi skupne objave in sodelovanje v projektih EU.

12. Označite, katerega od navedenih ciljev ste si zastavili pri projektu, katere konkretne rezultate ste dosegli in v kakšni meri so doseženi rezultati uporabljeni

Cilj	
<b>F.01</b>	<b>Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin</b>
Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
Rezultat	Dosežen
Uporaba rezultatov	V celoti
<b>F.02</b>	<b>Pridobitev novih znanstvenih spoznanj</b>
Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
Rezultat	Dosežen
Uporaba rezultatov	V celoti
<b>F.03</b>	<b>Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja</b>
Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
Rezultat	Dosežen
Uporaba rezultatov	V celoti

Cilj

**F.04 Dvig tehnološke ravni**

Zastavljen cilj  DA  NE

Rezultat

Uporaba rezultatov

**F.05 Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja**

Zastavljen cilj  DA  NE

Rezultat

Uporaba rezultatov

**F.06 Razvoj novega izdelka**

Zastavljen cilj  DA  NE

Rezultat

Uporaba rezultatov

**F.07 Izboljšanje obstoječega izdelka**

Zastavljen cilj  DA  NE

Rezultat

Uporaba rezultatov

**F.08 Razvoj in izdelava prototipa**

Zastavljen cilj  DA  NE

Rezultat

Uporaba rezultatov

**F.09 Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije**

Zastavljen cilj  DA  NE

Rezultat

Uporaba rezultatov

**F.10 Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije**

Zastavljen cilj  DA  NE

Rezultat

Uporaba rezultatov

**F.11 Razvoj nove storitve**

Zastavljen cilj  DA  NE

Rezultat

Uporaba rezultatov

**F.12 Izboljšanje obstoječe storitve**

Zastavljen cilj  DA  NE

Rezultat

Uporaba rezultatov



Cilj

**F.13 Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov**

Zastavljen cilj  DA  NE

Rezultat

Uporaba rezultatov

**F.14 Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih**

Zastavljen cilj  DA  NE

Rezultat

Uporaba rezultatov

**F.15 Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz**

Zastavljen cilj  DA  NE

Rezultat

Uporaba rezultatov

**F.16 Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz**

Zastavljen cilj  DA  NE

Rezultat

Uporaba rezultatov

**F.17 Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso**

Zastavljen cilj  DA  NE

Rezultat

Uporaba rezultatov

**F.18 Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi,**

Zastavljen cilj  DA  NE

Rezultat

Uporaba rezultatov

**F.19 Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")**

Zastavljen cilj  DA  NE

Rezultat

Uporaba rezultatov

**F.20 Ustanovitev novega podjetja ("spin off")**

Zastavljen cilj  DA  NE

Rezultat

Uporaba rezultatov

**F.21 Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov**

Zastavljen cilj  DA  NE

Rezultat

Uporaba rezultatov

Cilj

**F.22 Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov**

Zastavljen cilj  DA  NE

Rezultat Dosežen

Uporaba rezultatov V celoti

**F.23 Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev**

Zastavljen cilj  DA  NE

Rezultat Dosežen

Uporaba rezultatov Ni uporabljen

**F.24 Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev**

Zastavljen cilj  DA  NE

Rezultat Dosežen

Uporaba rezultatov Ni uporabljen

**F.25 Razvoj novih organizacijskih in upravljavskih rešitev**

Zastavljen cilj  DA  NE

Rezultat Dosežen bo v naslednjih 3 letih

Uporaba rezultatov Delno

**F.26 Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev**

Zastavljen cilj  DA  NE

Rezultat Dosežen

Uporaba rezultatov Ni uporabljen

**F.27 Prispevek k ohranjanju/varovanje naravne in kulturne dediščine**

Zastavljen cilj  DA  NE

Rezultat Dosežen bo v naslednjih 3 letih

Uporaba rezultatov Delno

**F.28 Priprava/organizacija razstave**

Zastavljen cilj  DA  NE

Rezultat Dosežen

Uporaba rezultatov Ni uporabljen

**F.29 Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete**

Zastavljen cilj  DA  NE

Rezultat Dosežen

Uporaba rezultatov Ni uporabljen

**F.30 Strokovna ocena stanja**

Zastavljen cilj  DA  NE

Rezultat Dosežen

Uporaba rezultatov Ni uporabljen

Cilj

**F.31 Razvoj standardov**

Zastavljen cilj  DA  NE

Rezultat

Uporaba rezultatov

**F.32 Mednarodni patent**

Zastavljen cilj  DA  NE

Rezultat

Uporaba rezultatov

**F.33 Patent v Sloveniji**

Zastavljen cilj  DA  NE

Rezultat

Uporaba rezultatov

**F.34 Svetovalna dejavnost**

Zastavljen cilj  DA  NE

Rezultat

Uporaba rezultatov

**F.35 Drugo**

Zastavljen cilj  DA  NE

Rezultat

Uporaba rezultatov

**Komentar**

**13. Označite potencialne vplive oziroma učinke vaših rezultatov na navedena področja**

Vpliv	
<b>G.01. Razvoj visokošolskega izobraževanja</b>	
G.01.01. Razvoj dodiplomskega izobraževanja	<input type="radio"/> Ni vpliva <input checked="" type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.01.02. Razvoj podiplomskega izobraževanja	<input type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input checked="" type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.01.03. <input type="text" value="Drugo ni dodatnega vpliva"/>	<input checked="" type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
<b>G.02. Gospodarski razvoj</b>	
G.02.01. Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	<input type="radio"/> Ni vpliva <input checked="" type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.02.02. Širitev obstoječih trgov	<input type="radio"/> Ni vpliva <input checked="" type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.02.03. Znižanje stroškov proizvodnje	<input type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input checked="" type="radio"/> Velik vpliv
G.02.04. Zmanjšanje porabe materialov in energije	<input type="radio"/> Ni vpliva <input checked="" type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.02.05. Razširitev področja dejavnosti	<input checked="" type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.02.06. Večja konkurenčna sposobnost	<input type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input checked="" type="radio"/> Velik vpliv
G.02.07. Večji delež izvoza	<input type="radio"/> Ni vpliva <input checked="" type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.02.08. Povečanje dobička	<input type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input checked="" type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv

Vpliv		
G.02.09.	Nova delovna mesta	<input checked="" type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	<input checked="" type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.02.11.	Nov investicijski zagon	<input checked="" type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.02.12.	<input type="text" value="Drugo ni dodatnega vpliva"/>	<input checked="" type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
<b>G.03.</b>	<b>Tehnološki razvoj</b>	
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti	<input checked="" type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti	<input checked="" type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij	<input type="radio"/> Ni vpliva <input checked="" type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.03.04.	<input type="text" value="Drugo ni dodatnega vpliva"/>	<input checked="" type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
<b>G.04.</b>	<b>Družbeni razvoj</b>	
G.04.01.	Dvig kvalitete življenja	<input type="radio"/> Ni vpliva <input checked="" type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.04.02.	Izboljšanje vodenja in upravljanja	<input checked="" type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.04.03.	Izboljšanje delovanja administracije in javne uprave	<input checked="" type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.04.04.	Razvoj socialnih dejavnosti	<input checked="" type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.04.05.	Razvoj civilne družbe	<input checked="" type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.04.06.	<input type="text" value="Drugo ni dodatnega vpliva"/>	<input checked="" type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
<b>G.05.</b>	<b>Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in identitete</b>	<input type="radio"/> Ni vpliva <input checked="" type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
<b>G.06.</b>	<b>Varovanje okolja in trajnostni razvoj</b>	<input type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input checked="" type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
<b>G.07.</b>	<b>Razvoj družbene infrastrukture</b>	
G.07.01.	Informacijsko-komunikacijska infrastruktura	<input checked="" type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.07.02.	Prometna infrastruktura	<input checked="" type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.07.03.	Energetska infrastruktura	<input checked="" type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
G.07.04.	<input type="text" value="Drugo ni dodatnega vpliva"/>	<input checked="" type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
<b>G.08.</b>	<b>Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva</b>	<input type="radio"/> Ni vpliva <input checked="" type="radio"/> Majhen vpliv <input type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv
<b>G.09.</b>	<input type="text" value="Drugo Zdrava hrana"/>	<input type="radio"/> Ni vpliva <input type="radio"/> Majhen vpliv <input checked="" type="radio"/> Srednji vpliv <input type="radio"/> Velik vpliv

#### Komentar

#### 14. Naslov spletne strani za projekte, odobrene na podlagi Javnih razpisov za sofinanciranje ciljnih raziskovalnih projektov za leta 2017, 2018 in 2019

## C. Izjave

### Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni;
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja in obdelavo teh podatkov za evidence ARRS;
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki (v primeru, da poročilo ne bo oddano z digitalnimi podpisoma);
- so z vsebino poročila seznanjeni in se strinjajo vsi soizvajalci projekta;
- bomo sofinancerjem istočasno z zaključnim poročilom predložili tudi elaborat, ki ga bomo posredovali v digitalni obliki ali po pošti, skladno z zahtevami sofinancerjev.

Potrjujemo zgoraj navedene izjave.

### Podpisa:

Zastopnik oz. pooblaščenca oseba

in

Vodja programa/projekta

ŽIG

Datum: 13. 08. 2022

Oznaka obrazca: 3r6a-1hvk-q02l-ip4j-wa2j-ixli-0



REPUBLIKA SLOVENIJA  
**MINISTRSTVO ZA KMETIJSTVO,  
GOZDARSTVO IN PREHRANO**

## **ZAKLJUČNO POROČILO:**

### **Možnosti obvladovanja paratuberkuloze v rejah krav molznic in dvig konkurenčnosti slovenske govedoreje**

**CRP V4-1805**

1.11.2018–31.10.2021

Raziskovalni projekt Ciljnega raziskovalnega programa »Zagotovimo.si hrano za jutri« v letu 2018

Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani



Univerza v Ljubljani  
*Veterinarska* fakulteta

**Ljubljana, december 2022**

**Naročnik:** Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano RS (MKGP)  
Dunajska cesta 22, 1000 Ljubljana

**Sofinancerji:** MKGP (Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano RS)  
ARRS (Javna agencija za raziskovalno dejavnost RS)

**Skrbnik pogodbe MKGP:** Metka Kalinšek

**Vsebinski spremljevalec:** mag. Breda Hrovatin

**Številka projekta:** V4-1805

**Trajanje projekta:** 1.11.2018 – 31.10.2021

**Naslov projekta:** Možnosti obvladovanja paratuberkuloze v rejah krav molznic in dvig konkurenčnosti slovenske govedoreje  
(angl. *Rising the competitive position of Slovenian cattle farming by controlling paratuberculosis in dairy cattle herds*)

**Ključne besede projekta:** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, paratuberkuloza, krave molznice, govedoreja, ekonomski model, stroški bolezni

**Nosilna RO:** Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta (VF)

**Sodelujoče RO:** Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta (BF)

**Raziskovalno področje (ARRS):** 4.04.02 Biotehnika/Veterina/Animalna patologija in epizootiologija

**Raziskovalno področje (FOS):** 4.03 Kmetijske vede in veterina – Veterina

**Vodja projekta (in šifra):** Matjaž Ocepek (11133), e-mail: matjaz.ocepek@vf.uni-lj.si

**Ostali člani projektne skupine:** Jana Avberšek<sup>a</sup>, Petra Bandelj<sup>a</sup>, Jožica Ježek<sup>b</sup>, Maja Kavalič<sup>a</sup>, Marija Klopčič<sup>e</sup>, Tanja Knific<sup>c</sup>, Branko Krt<sup>a</sup>, Darja Kušar<sup>a</sup>, Marija Nemeč<sup>b</sup>, Bojan Papič<sup>a</sup>, Mateja Pate<sup>a</sup>, Tina Pirš<sup>a</sup>, Milojka Šetina<sup>a</sup>, Jože Starič<sup>b</sup>, Tanja Švara<sup>d</sup>, Anita Ule<sup>e</sup>, Urška Zajc<sup>a</sup>, Irena Zdovc<sup>a</sup>

<sup>a</sup> VF, Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana

<sup>b</sup> VF, Klinika za reprodukcijo in velike živali, Cesta v Mestni log 47, 1000 Ljubljana

<sup>c</sup> VF, Inštitut za varno hrano, krmo in okolje, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana

<sup>d</sup> VF, Inštitut za patologijo, divjad, ribe in čebele, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana

<sup>e</sup> BF, Inštitut za živinorejo, Groblje 3, 1230 Domžale

## Povzetek

Paratuberkuloza, ki jo povzroča bakterija vrste *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), je neozdravljiva, nalezljiva, kronična bolezen prebavil goveda in drobnice, ki zelo ogroža ekonomičnost rej prežvekovalcev v Sloveniji in v svetu. V okviru predlaganega projekta smo želeli ugotoviti prevalenco paratuberkuloze v večjih rejah krav molznic ter razširjenost povzročitelja v okolju, oceniti ekonomske posledice bolezni v okuženih rejah v Sloveniji, predlagati ukrepe za nadzor bolezni, vpeljati in spremljati učinkovitost predlaganih ukrepov v okuženih rejah, preučiti možnost vpeljave sistema certificiranja rej prostih te bolezni, da bi omogočili rejcem nakup zdravih živali iz negativnih rej in hkrati povečali vrednost živali iz takih rej pri domačem in mednarodnem trgovanju ter zmanjšati prisotnost povzročitelja paratuberkuloze v prehranski verigi in okolju.

V okviru projekta smo izvedli statično in časovno analizo omrežja premikov govedi in preučili njihov vpliv na širjenje povzročitelja med rejami. Naši rezultati kažejo, da analiza omrežja premikov govedi lahko pripomore k optimizaciji spremljanja in obvladovanja paratuberkuloze v Sloveniji. Z upoštevanjem danih predpostavk in negotovosti je bilo ocenjeno, da je splošno tveganje za izpostavljenost MAP preko mleka in mlečnih izdelkov za slovenskega potrošnika majhno. S programom @RISK smo na podlagi pridobljenih podatkov pripravili osnovni bio-ekonomski model mlečne črede, ki se nadgrajuje z vplivi paratuberkuloze na proizvodnjo. Ker je vpliv paratuberkuloze pri klinično in subklinično obolelih živalih različen, smo na ravni živali uvedli tri podmodele. Za oceno števila MAP v vzorcih fecesa smo molekularno metodo qPCR, ki temelji na pomnoževanju gena F57, validirali in umerili z digitalnim PCR. Ugotovljena meja detekcije (300 MAP/g) in meja kvantifikacije (892 MAP/g), kažeta na dobre lastnosti testa. Prevalenco paratuberkuloze smo ugotavljali v rejah bikovskih mater črno bele pasme. V letu 2019 je bilo pregledanih 188 skupinskih vzorcev blata odvzetih v 89 rejah, štiri (4,49%) reje so bile pozitivne, v letu 2020/21 pa 246 vzorcev odvzetih v 118 rejah, pet (4,24%) rej je bilo pozitivnih. Obakrat je bilo pregledanih 84 rej, šest (7,14%) jih je bilo vsaj v enem letu pozitivnih. Podrobno smo pregledali 11 od 12 pozitivnih rej – tri so bile odkrite ob preliminarnem vzorčenju. Na osnovi ogleda farme smo podali priporočila za omejevanje nadaljnjih okužb v reji. Odvzeli smo vzorce blata in krvi vsem živalim starejših od dveh let, vzorce vode in skupinski vzorci mleka. Skupaj smo tako pregledali 1.015 živali, 28 vzorcev vode in sedem vzorcev mleka. Pozitivnih je bilo 191 vzorcev blata živali iz desetih farm, povprečna prevalenca v rejah je bila 13,6 %. Pozitivnih je bilo tudi osem vzorcev vode. Vsaj en vzorec vode je bil pozitiven v štirih rejah, medtem ko so bili vsi vzorci mleka negativni. Povprečna seroprevalenca v rejah (test ELISA) je bila 7,1 %. Pri 188 živalih (v vsaki reji smo izbrali pare krav okužena – zdrava, ki so bile v enaki fazi laktacije in enako stare ter so imele enako mlečnost) smo izmerili sposobnost vezave železa (TIBC), vsebnost vitamina D3 in skupno antioksidantno kapaciteto (TAS) v krvnem serumu. Pri zdravih kravah smo ugotovili statistično značilno višjo vrednost TAS v primerjavi z okuženimi. Ugotovili smo statistično značilno pozitivno korelacijo med preiskovanimi biokemijski parametri in vrednostjo testa qPCR (vrednost Ct). Pri živalih, ki izločajo več bakterij (MAP), se rezultati preiskovanih biokemijskih parametrov slabšajo, kar pripisujemo vplivom bolezni. S podrobno analizo premikov govedi v in iz 11 pozitivnih rej smo identificirali 45 gospodarstev, ki imajo višje tveganje za prisotnost paratuberkuloze. Na osnovi vseh rezultatov smo pripravili predlog pravilnika o pogojih za priznanje, pridobitev in vzdrževanje statusa črede, proste paratuberkuloze.



## Summary

Paratuberculosis, caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), is an incurable, contagious, chronic disease of the gastrointestinal tract of cattle and small animals, which is a major threat to the profitability of ruminant farming in Slovenia and worldwide. In the proposed project, we aimed to determine the prevalence of paratuberculosis in larger dairy herds and the presence of the pathogen in the environment, evaluate the economic impact of the disease in infected herds in Slovenia, propose measures to control the disease, implement the proposed measures in infected herds and monitor their effectiveness, explore the possibility of introducing a system of certification of farms free of the disease to enable breeders to purchase healthy animals from negative farms, while increasing the value of animals from such farms in domestic and international trade and reducing the presence of the paratuberculosis pathogen in the food chain and in the environment.

As part of the project, we performed a static and temporal analysis of the network of cattle movements and studied their influence on the spread of the pathogen between herds. Our results show that the analysis of the cattle movement network can help to optimize the surveillance and control of paratuberculosis in Slovenia. Considering the given assumptions and uncertainties, it was estimated that the overall risk of exposure to MAP via milk and dairy products for Slovenian consumers is low. Using the program @RISK, we created a basic bioeconomic model of the dairy herd based on the obtained data, which was extended to include the impact of paratuberculosis on production. Because the impact of paratuberculosis is different in clinically and subclinically diseased animals, we introduced three submodels at the animal level. To assess the number of MAP in fecal samples, the molecular method qPCR, based on amplification of the F57 gene, was validated and calibrated by digital PCR. The determined limit of detection (300 MAP/g) and limit of quantification (892 MAP/g feces) indicate good characteristics of the test. The prevalence of paratuberculosis was determined in breeding bull mothers herds of black and white breed. In 2019, 188 group fecal samples were collected from 89 farms, four (4.49%) farms were positive; in 2020/21, 246 samples were collected from 118 farms, five (4.24%) farms were positive. Both times, 84 farms were tested and six (7.14%) were positive for at least one year. We thoroughly investigated 11 of the 12 positive farms - three were detected during pre-sampling. Based on the farm visit, we made recommendations to limit further infections in the breed. Fecal and blood samples, water samples, and group milk samples were collected from all animals older than two years. We tested a total of 1015 animals, 28 water samples, and seven milk samples. Regarding animal fecal samples, 191 samples from 10 farms were positive, and the average on-farm prevalence was 13.6%. Eight water samples were also positive. At least one water sample was positive in four farms, while all milk samples were negative. The average on-farm seroprevalence (ELISA test) was 7.1%. Iron binding capacity (TIBC), vitamin D3 content and total antioxidant capacity (TAS) in blood serum were inspected. We found a statistically significant higher TAS value in healthy cows compared to infected cows. We found a statistically significant positive correlation between the biochemical parameters studied and the qPCR result (Ct value). In animals excreting more bacteria (MAP), the results of the studied biochemical parameters worsened, which is attributed to the effects of the disease. Through a detailed analysis of the movement of cattle to and from 11 positive farms, we identified 45 farms at increased risk for the occurrence of paratuberculosis. Based on all the results, we prepared a draft set of rules on the conditions for recognition, acquisition, and maintenance of paratuberculosis-free status.

## Kazalo vsebine

<b>Povzetek</b> .....	<b>1</b>
<b>Summary</b> .....	<b>2</b>
<b>Kazalo vsebine</b> .....	<b>3</b>
<b>Seznam preglednic</b> .....	<b>5</b>
<b>Seznam slik</b> .....	<b>5</b>
<b>Seznam kratic</b> .....	<b>7</b>
<b>1 OPREDELITEV PROBLEMA IN CILJI RAZISKAVE</b> .....	<b>8</b>
<b>2 PREGLED LITERATURE</b> .....	<b>10</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>12</b>
<b>3.1 Ugotavljanje prevalece paratuberkuloze v rejah krav molznic (DS1)</b> .....	<b>12</b>
3.1.1 Priprava vprašalnika in izdelava podrobnega načrta vzorčenja.....	12
3.1.2 Vzorčenje .....	13
3.1.3 Molekularne in bakteriološke preiskave vzorcev.....	13
<b>3.2 Ugotavljanje odpornosti živali na okužbo z MAP s pomočjo izbranih biokemijskih pokazateljev (DS1)</b> .....	<b>14</b>
<b>3.3 Ugotavljanje epidemioloških povezav pozitivnih rej (DS1)</b> .....	<b>14</b>
<b>3.4 Ukrepi v pozitivnih rejah (DS2)</b> .....	<b>15</b>
3.4.1 Ugotavljanje razširjenosti v reji .....	15
3.4.2 Modeliranje prevalece na ravni črede .....	15
3.4.3 Izdelava individualnih predlogov za nadzor bolezni v posameznih rejah.....	16
<b>3.5 Izdelava ocene ekonomskega vpliva bolezni (DS3)</b> .....	<b>17</b>
3.5.1 Izdelava bio-ekonomskega modela reje .....	17
3.5.2 Bio-ekonomski model vpliva paratuberkuloze.....	18
3.5.3 Izpostavljenost slovenskega potrošnika bakteriji MAP v mleku.....	18
<b>3.6 Izdelava predloga za certificiranje rej (DS4)</b> .....	<b>19</b>
<b>4 REZULTATI</b> .....	<b>20</b>
<b>4.1 Ugotavljanje prevalece paratuberkuloze</b> .....	<b>20</b>
4.1.1 Rezultati prelimenarnega vzorčenja.....	20
4.1.2 Rezultati skupinskih vzorcev.....	20
4.1.3 Validacija testa qPCR.....	21
4.1.4 Analiza vprašalnikov.....	21
<b>4.2 Ugotavljanje odpornosti živali na okužbo z MAP s pomočjo izbranih biokemijskih pokazateljev</b> .....	<b>22</b>
<b>4.3 Ugotavljanje epidemioloških povezav pozitivnih rej</b> .....	<b>25</b>
<b>4.4 Ukrepi v pozitivnih rejah</b> .....	<b>29</b>
4.4.1 Ugotavljanje razširjenosti v reji .....	29
4.4.2 Modeliranje prevalece na ravni črede .....	30
<b>4.5 Izdelava ocene ekonomskega vpliva bolezni</b> .....	<b>33</b>
4.5.1 Bio-ekonomski model vpliva paratuberkuloze.....	33
4.5.2 Izpostavljenost slovenskega potrošnika bakteriji MAP v mleku.....	37
<b>4.6 Predlog za certificiranje rej/ predloga pravilnika o pogojih za priznanje, pridobitev in vzdrževanje statusa črede, proste paratuberkuloze (Johnejeve bolezni) pri govedu</b> .....	<b>39</b>
<b>5 RAZPRAVA</b> .....	<b>39</b>

<b>5.1</b>	<b>Ocena prevalece paratuberkuloze v Sloveniji</b> .....	<b>39</b>
5.1.1	<i>Empirična raziskava</i> .....	39
5.1.2	<i>Modelna raziskava</i> .....	40
<b>5.2</b>	<b>Ocena ekonomskih posledic paratuberkuloze</b> .....	<b>41</b>
5.2.1	<i>Bio-ekonomski model vpliva paratuberkuloze</i> .....	41
5.2.2	<i>Izpostavljenost slovenskega potrošnika bakteriji MAP v mleku</i> .....	42
<b>6</b>	<b>ZAKLJUČKI</b> .....	<b>43</b>
<b>7</b>	<b>PRILOGE POROČILA</b> .....	<b>44</b>
<b>8</b>	<b>VIRI</b> .....	<b>44</b>

## Seznam preglednic

- Preglednica 1.** Podatki o izbranih parih živali (srednja vrednost, min. in maks. vrednost). (str. 13)
- Preglednica 2.** Rezultati skupinskih vzorcev. (str. 19)
- Preglednica 3.** Rezultati biokemijskih preiskav pri okuženih in zdravih živalih (srednja vrednost, min. in maks. vrednost). (str. 21)
- Preglednica 4.** Vsebnost vitamina D3 pri skupinah krav glede na status okuženosti z MAP. (str. 22)
- Preglednica 5.** Vrednost TIBC pri skupinah krav glede na status okuženosti z MAP. (str. 23)
- Preglednica 6.** Vrednost TAS pri skupinah krav glede na status okuženosti z MAP. (str. 24)
- Preglednica 7.** Rezultati qPCR in ELISA po farmah. (str. 29)
- Preglednica 8.** Povzetek opredelitve tveganja po vrsti mleka na ravni kmetije in mlečne industrije ter splošna izpostavljenost povprečnega slovenskega potrošnika. (str. 37)

## Seznam slik

- Slika 1.** Diagram modela za širjenje (MAP) v tipični slovenski čredi krav molznic. (str.15)
- Slika 2.** Shema strukture modela za kvantitativno oceno tveganja izpostavljenosti MAP preko različnih vrst mleka za slovenskega potrošnika. (str. 18)
- Slika 3.** Odgovori rejcev na vprašanje, kako dobro poznajo bolezen imenovano paratuberkuloza. (str. 20)
- Slika 4.** Prikaz korelacij med vsebnostjo vitamina D3 in vrednostjo Ct pri testu qPCR. (str. 21)
- Slika 5.** Prikaz vsebnosti vitamina D3 pri skupinah krav glede na status okuženosti z MAP. (str. 22)
- Slika 6.** Prikaz korelacij med vrednostjo TIBC in okuženostjo z MAP. (str. 22)
- Slika 7.** Prikaz vrednosti TIBC pri skupinah krav glede na status okuženosti z MAP. (str. 23)
- Slika 8.** Prikaz korelacij med vrednostjo TAS in okuženostjo z MAP. (str. 23)
- Slika 9.** Prikaz vrednosti TAS pri skupinah krav glede na status okuženosti z MAP. (str. 24)
- Slika 10.** Graf agregiranih premikov med različnimi tipi gospodarstev. (str. 25)
- Slika 11.** Grafi premikov goveda na letnih omrežjih v klastru povezanih gospodarstev v Bovcu. (str.25)
- Slika 12.** Število premikov živali po mesecih od 1. 8. 2011 do 31. 7. 2016. (str. 26)
- Slika 13.** Ciljna odstranitev vozlišč v petem letnem omrežju na podlagi (A) skupne stopnje, (B) vmesnost in (C) središčnost od prvega do zadnjega proučevanega leta in (D) primerjava učinkovitosti med temi tremi merami središčnosti v četrtem letu. (str. 27)
- Slika 14.** Krivulje okužb (črte – povprečje za 1.000 realizacij modela; površina – razpon) v časovni mrežni premikov goveda za različne verjetnosti prenosa. (str. 28)
- Slika 15.** Demonstracija ene ponovitve simulacije modela, ki predstavlja rezultate na ravni ene črede. (str. 30)
- Slika 16.** Frekvenčna porazdelitev (A) prevalence MAP v čredi in (B) delež subklinično okuženih krav in (C) klinično okuženih krav. (str. 30)
- Slika 17.** Korelacije med prevalenco MAP znotraj črede in (A) deležem subklinično okuženih krav in (B) klinično okuženih krav v čredi. (str. 31)
- Slika 18.** Korelacija med deležem subklinično in klinično okuženimi kravami v MAP pozitivni čredi. (str. 31)

- Slika 19.** Porazdelitev živali po posameznih zdravstvenih stanjih v modelu širjenja MAP v tipični slovenski molznici. (str. 32)
- Slika 20.** Verjetnostna porazdelitev pokritja na ravni krave molznice. (str. 33)
- Slika 21.** Verjetnostna porazdelitev celotnih prihodkov na ravni krave molznice. (str. 33)
- Slika 22.** Verjetnostna porazdelitev spremenljivih stroškov na ravni krave molznice. (str. 34)
- Slika 23.** Verjetnostna porazdelitev deleža subklinično in klinično okuženih živali v MAP pozitivni čredi. (str. 35)
- Slika 24.** Verjetnostna porazdelitev pokritja na ravni črede krav molznic. (str. 35)
- Slika 25.** Verjetnostna porazdelitev celotnih prihodkov na ravni črede krav molznic. (str. 36)
- Slika 26.** Verjetnostna porazdelitev spremenljivih stroškov na ravni črede krav molznic. (str. 36)
- Slika 27.** Diskretna verjetnost kontaminacije MAP na liter (A) surovega mleka in (B) pasteriziranega mleka na kmetiji, ki je MAP pozitivna. (str. 37)

## Seznam kratic

<b>CFU</b>	kolonijske enote (angl. <i>colony forming units</i> )
<b>CV</b>	koeficient variacije (angl. <i>coefficient of variation</i> )
<b>Cq</b>	pražni (Ct) ali kvantifikacijski (Cq) cikel pri qPCR (angl. <i>threshold cycle</i> ali <i>quantification cycle</i> )
<b>dPCR</b>	digitalni PCR (angl. <i>digital PCR</i> )
<b>DS</b>	delovni sklop
<b>ELISA</b>	encimskoimunski test ELISA (angl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
<b>KIS</b>	Kmetijski inštitut Slovenije
<b>LOD</b>	meja detekcije, meja zaznave (angl. <i>limit of detection</i> )
<b>LOQ</b>	meja kvantifikacije (angl. <i>limit of quantification</i> )
<b>MAP</b>	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>
<b>MST</b>	minimalno vpeto drevo (angl. <i>minimum spanning tree</i> )
<b>NGS</b>	sekvenciranje naslednje generacije (angl. <i>next generation sequencing</i> )
<b>NVI</b>	Nacionalni veterinarski inštitut (VF–NVI)
<b>PCR</b>	verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>polymerase chain reaction</i> )
<b>qPCR</b>	PCR v realnem času (angl. <i>real-time PCR</i> ali <i>quantitative PCR</i> )
<b>SD</b>	standardna deviacija
<b>SURS</b>	Statistični urad Republike Slovenije
<b>TAS</b>	skupna antioksidantna kapaciteta (angl. <i>total antioxidant status</i> )
<b>TIBC</b>	sposobnost vezave železa (angl. <i>total iron binding capacity</i> )
<b>UVHVVR</b>	Uprava za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin
<b>VF</b>	Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani
<b>WGS</b>	sekvenciranje celotnih genomov (angl. <i>whole genome sequencing</i> )

## 1 OPREDELITEV PROBLEMA IN CILJI RAZISKAVE

Paratuberkuloza, ki jo povzroča bakterija vrste *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), je nalezljiva kronična bolezen prebavil goveda in drobnice, pa tudi nekaterih drugih domačih in divjih živali (srnjad, zajci, lisice, ...). Bolezen sta prvič opisala Johne in Frothingham leta 1895. Paratuberkuloza je ena od bolezni, ki zelo ogrožajo ekonomičnost rej prežvekovalcev v Sloveniji in v svetu. Za okužbo so najdovzетnejše mlade živali. Večinoma se okužijo že v prvem mesecu življenja, izjemoma do šestega meseca starosti. Zbolijo po navadi šele od dve do deset let pozneje. S starostjo živali postanejo odpornejše; velik odmerek zaužitih bakterij, pogosta izpostavljenost, genetska dovzetnost in druge bolezni pa so dejavniki, ki vplivajo na možnost okužbe odraslih živali. Z MAP se lahko okužijo vse pasme goveda, vendar so nekatere bolj dovzetne, npr. jersey, limousin in črno-bela pasma. Za paratuberkulozo je značilen t.i. fenomen ledene gore: vsaka žival s kliničnimi znaki bolezni pomeni, da je v čredi s 100 živalmi vsaj še 15-25 živali v latentni oziroma subklinični fazi.

Najpogostejši način okužbe je fekalno-oralni, torej preko vode in krme, onesnažene z iztrebki, v katerih so prisotne mikobakterije. Novorojena teleta se okužijo prek kontaminiranih seskov, lahko pa tudi z mlezivom (v 15 %) ali mlekom (v 5 %) okuženih krav. V primerih, ko matere kažejo klinične znake, je možna tudi intrauterina okužba (v 20 %). Glavni vir okužbe za živali v čredi so živali s kliničnimi znaki, ki z iztrebki izločajo večje število MAP. Glede na število izločenih bakterij je lahko izločanje MAP z iztrebki šibko, zmerno in močno, izločanje pa je lahko prehodno, občasno ali stalno.

Okužbo z MAP lahko opredelimo s štirimi stopnjami:

- Prva faza je prikrita okužba brez kliničnih znakov, živali MAP izločajo z iztrebki, vendar v koncentraciji pod ravniyo zaznave z večino rutinskih diagnostičnih metod. Prikrita okužba po navadi traja najmanj dve leti, včasih tudi deset let ali več, vendar lahko živali v čredah z visoko prevalenco paratuberkuloze napredujejo iz prikrite okužbe do klinične faze že v prvem letu starosti. Teleta sicer razvijejo merljiv humoralni in celični imunski odgovor, vendar kljub temu komercialno dostopni encimsko-immunski testi ELISA niso dovolj občutljivi za določanje prikritih okužb.
- Živali v drugi fazi okužbe imajo večjo koncentracijo MAP v tkivu črevesja, večina jih izloča MAP z iztrebki in tako kontaminira okolje, zato so vir okužb za druge živali. Na napredovanje bolezni v tej fazi vplivajo različni dejavniki: starost, pri kateri je žival prvič izpostavljena MAP, doza MAP pri prvem stiku, pogostost ponovne izpostavljenosti MAP, genetski dejavniki gostitelja in bakterije, dejavniki okolja, prehrana gostitelja, proizvodnja mleka in drugi stresni dejavniki. Večina živali v tej fazi gre v zakol zaradi neplodnosti, mastitisa in zmanjšane proizvodnje mleka. Živali v tej fazi lahko izločajo MAP tudi v mleko.
- Živali v tretji fazi postopno izgubljajo telesno težo, pojavi se driska, ki lahko s prekinitvami traja več tednov. Ob normalnem apetitu se postopoma razvijeta mršavost in shiranost, zmanjša se proizvodnja mleka. Skoraj vse živali v tej fazi so pozitivne v bakteriološki preiskavi blata in imajo običajno povišan protitelesni odgovor, ki ga lahko določimo s testi ELISA. Pri teh živalih je večja možnost za prenos okužbe in utero, pri njih pogosteje določimo MAP v mleku, poleg tega izločajo velike koncentracije MAP z iztrebki in so tako pomemben vir kontaminacije okolja, vključno s krmo.
- Živali v zadnji fazi so šibke, shirane in imajo običajno kronično, obilno drisko. Zaradi izgubljanja beljakovin se pri nekaterih živalih pojavi intermandibularni edem. Živali lahko hitro (v nekaj tednih) napredujejo iz druge v četrto fazo, vendar je značilnejše postopno napredovanje. V tej fazi živali izločajo velike količine MAP z iztrebki in mlekom.

Zgodnje ugotavljanje bolezní je zaradi odsotnosti oziroma nespecifičnosti klinične slike težavno, za šírenje okužbe pa so najpomembnejše živali v subklinični fazi, ki lahko izločajo mikobakterije že do leto in pol pred pojavom kliničnih znakov. Tako onesnažijo pašnike, krmo in vodo. Mikobakterije so zelo odporne na vročino, mraz, sončno svetlobo, izsuševanje in običajna razkužila, tako da lahko v okolju preživijo več kot leto dni. MAP lahko preživi tudi v praživalih, žuželkah in nematodih in se tako lahko kot znotrajcelični patogen razmnožuje v okolju. Ker se bolezen vnese v čredo zlasti z nakupom na videz zdravih, a okuženih živali, je priporočljivo vzdrževati zaprto rejo ali pa živali dokupovati iz čred, ki so dokazano proste paratuberkuloze. Pomemben je namreč status črede, ne posamezne živali, saj je ugotavljanje prisotnosti MAP pri posamezni živali pogosto nezanesljivo.

Za zdravljenje paratuberkuloze ni učinkovitega antibiotika, zato je poudarek predvsem na preprečevanju in nadzoru bolezní. Rejci običajno zadržijo žival v reji kolikor je mogoče dolgo, če daje razmeroma veliko mleka, kar pomeni, da gre do živali s paratuberkulozo v zakol zelo pozno, šele v klinični fazi. Za nadzor bolezní v rejah je pomembno zgodnje ugotavljanje okužb, saj bi morali rejci živali okužene z MAP izločiti pred razvojem končne faze bolezní. Poleg tega so pomembne spremembe v tehnologiji in upravljanju reje.

Za nadzor bolezní v posamezni čredi lahko pride v poštev tudi cepljenje, vendar so mnenja o njegovi primernosti močno deljena, saj je posledično oteženo ugotavljanje bolezní, možne pa so tudi navzkrižne reakcije pri kožnem testu na govejo tuberkulozo. Cepljenje sicer v veliki meri prepreči pojav kliničnih znakov in zmanjša izločanje MAP z iztrebki in mlekom, bolezní pa ne ozdravi. Za obvladovanje bolezní so ključnega pomena zoohigienski ukrepi.

V Evropski uniji še ni obveznega programa za nadzor paratuberkuloze, ki bi ga predpisala Evropska komisija. V različnih regijah in državah so v preteklih letih razvili številne sheme nadzora kot odgovor na povečano zaskrbljenost zaradi šírenja paratuberkuloze v Evropi, vendar so pobude za nadzor bolezní po večini lokalnega značaja, financiranje pa omejeno na interesne skupine, npr. na mlečno in mesno industrijo ter na rejce. V novi zakonodaji EU o zdravju živali je paratuberkuloza uvrščena na seznam bolezní iz skupine E, za katere velja obveza za notifikacijo.

V Sloveniji trenutno še ni predpisanih ukrepov za omejevanje oziroma nadzor bolezní in pričakujemo lahko, da bo v naslednjih nekaj letih s paratuberkulozo okužen večji del populacije krav molznic v Sloveniji. Nekateré države Evropske unije so že uvedle stroge ukrepe za preprečevanje paratuberkuloze, ki terjajo od rejcev odsotnost bolezní v čredi, če želijo oddajati mleko za javno potrošnjo. Glede na to, da gre velik del slovenskega mleka vsakodnevno v mlekarne izven Slovenije, bi bilo smiselno tudi v Sloveniji vpeljati program nadzora in izkoreninjenja paratuberkuloze, ki bi obsegal sistematično spremljanje bolezní in certificiranje neokuženih rej. To bi rejcem omogočilo nakup zdravih živali in povečalo vrednost živali iz neokuženih rej pri trgovanju, dobili pa bi tudi individualno strokovno pomoč pri pripravi ukrepov za omejitev bolezní v reji. Za uspeh takega programa pa je seveda ključnega pomena dobro sodelovanje državnih organov, govedorejcev, govedorejskih združenj in veterinarjev.

Obstaja utemeljen sum, da MAP lahko predstavlja tveganje za zdravje ljudi. Domnevajo, da je lahko povzročitelj Crohnove in nekaterih drugih bolezní. Čeprav podrobnosti o načinu in posledicah okužbe niso znane, raziskovalci poudarjajo, da je pomembno boljše razumeti tveganje izpostavljenosti človeka. Možni viri okužbe za ljudi vključujejo kontaminirano hrano (npr. mleko in mlečni izdelki, surovo meso), vodo, okolje in neposreden stik z okuženimi živalmi. Waddell in sod. (2016) navajajo, da so ljudje, ki uživajo običajno prehrano, najverjetneje vsaj občasno izpostavljeni MAP. V nekaterih kmetijsko pomembnih državah je bolezen že razglašena za zoonozo oziroma se izvajajo ukrepi za preprečitev vstopa povzročitelja v prehransko verigo.



Cilji predlaganega projekta so bili:

- a) ugotoviti prevalenco paratuberkuloze v večjih rejah krav molznic ter razširjenost povzročitelja v okolju,
- b) oceniti stroške, ki jih bolezen povzroča v okuženih rejah v Sloveniji, ob upoštevanju vpliva morebitnih sekundarnih oziroma sočasnih bolezni, danih predpostavk in negotovosti
- c) predlagati ukrepe za nadzor bolezni,
- d) vpeljati in spremljati učinkovitost predlaganih ukrepov v okuženih rejah,
- e) preučiti možnost vpeljave sistema certificiranja rej prostih te bolezni, da bi omogočili rejcem nakup zdravih živali iz negativnih rej in hkrati povečali vrednost živali iz takih rej pri domačem in mednarodnem trgovanju,
- f) zmanjšati prisotnost povzročitelja paratuberkuloze v prehranski verigi in okolju.

## 2 PREGLED LITERATURE

Paratuberkuloza je razširjena po vsem svetu (Kennedy in Benedictus, 2001), najbolj v ZDA in v Avstraliji, v Evropi pa predvsem v zahodnih državah. V Evropi je bilo opravljenih precej raziskav o prevalenci paratuberkuloze pri različnih farmskih živalih, vendar primerljivih podatkov ni bilo mogoče izračunati. Ocenjujejo, da je splošna prevalenca pri govedu znotraj rej približno 20 %. V številnih državah pa je prevalenca na ravni čred verjetno več kot 50 % (Nielsen in Toft, 2009).

V Sloveniji je bila prvič ugotovljena leta 1961 pri uvoženem govedu pasme Jersey. Od prvega opisanega primera pa do izbruha v čredi ovac leta 1993 nato ni bilo poročil o bolezni. Med letoma 1995 in 2001 je na državni ravni potekalo spremljanje bolezni pri govedu na podlagi serološke diagnostike z različnimi testi in pri različnih kategorijah ter številu živali (Ocepek in sod., 1999, 2002). V letih 1995 in 1996 je bilo pregledanih 20 % oziroma 5 % živali v vseh čredah (Ocepek in sod., 1999). V naslednjih dveh letih so bili s testom ELISA, ki je postal najpogosteje uporabljeni test za ugotavljanje protiteles proti MAP, pregledani vzorci 3 % oziroma 5 % živali v vseh čredah (Ocepek in sod., 1999). Leta 1999 so bili pregledani vzorci 10-15 % krav in brejih telic, v naslednjih dveh letih pa so bile testirane le črede bikovskih mater (Ocepek in sod., 2002). Za obdobje med 2002 in 2007 ni podatkov o stanju glede paratuberkuloze v Sloveniji. Zadnja raziskava o razširjenosti paratuberkuloze je bila opravljena leta 2008 in je vključevala živali, starejše od dveh let, iz 20 % naključno izbranih čred krav molznic. Ugotovljena 18,5 % seroprevalenca na ravni čred (Kušar in sod., 2011) nas je uvrščala med države z relativno ugodno situacijo glede razširjenosti bolezni, a smo pozneje zaznali porast okuženosti govejih čred v Sloveniji. V zadnji opravljeni raziskavi smo v osmih naključno izbranih večjih rejah goveda (povprečna velikost črede 184 živali) v serumih živali v vseh rejah dokazali prisotnost protiteles proti MAP, pri živalih iz polovice rej pa smo z bakteriološko preiskavo potrdili tudi prisotnost bakterije MAP (Starič in sod., 2011). Molekularna preiskava vzorcev živali različnih starosti v subklinični fazi iz reje, kjer je bila bolezen v preteklosti že ugotovljena, je pokazala, da je v takih rejah lahko okužena velika večina živali (do 89 %; Logar in sod., 2012).

Pomanjkanje dovolj občutljivih, specifičnih in zanesljivih laboratorijskih testov je bilo v preteklosti najverjetneje vzrok za to, da so bili izločevalci MAP v čredah premalokrat prepoznani. Zato smo v okviru preteklega raziskovalnega dela razvili visoko učinkovito metodo za izolacijo DNA iz kompleksnih vzorcev, v tem primeru iz blata goveda, ter test PCR v realnem času, s katerim smo preiskali vzorce mleka in blata živali iz reje, v kateri je bila bolezen v preteklosti že ugotovljena. Test je primeren za ugotavljanje prisotnosti DNA MAP tako na ravni črede kot na ravni posamezne živali, ne glede na starost ali fazo proizvodnje (Logar in sod., 2012).

Bolezen v okuženih rejah povzroči več škode kot se zdi na prvi pogled. Okuženost živali z MAP ima neposreden vpliv na proizvodnost živali, ki se lahko zmanjša do 30 %, in izkoristek krme, ki upade za 12-25 %. Martins in sod. (2018) poročajo, da imajo okužene živali v mleku povečano število somatskih celic, v prvih petih laktacijah pa so MAP-pozitivne živali v povprečju dale 1.285 kg mleka manj kot MAP-negativne živali. Živali s paratuberkulozo so tudi mnogo bolj dovzetne za druge bolezni. Tako je lahko na primer število zaradi mastitisa izločenih živali v okuženih čredah kar do šestkrat večje kakor v neokuženih čredah. Daljši je tudi poporodni premor. V Evropi so ocenili, da finančna izguba na vsako okuženo žival brez znakov bolezni znaša 260 EUR, v ZDA pa naj bi izguba zaradi izpada dobička in drugih stroškov znašala v zmerno okuženih rejah 70 EUR, v močno okuženih rejah pa prek 150 EUR na vsako žival v čredi letno. Po grobih ocenah naj bi rejci črno-belega goveda pri nas zaradi paratuberkuloze letno utrpeli za 1-5 milijonov EUR izgub (Ocepek in sod., 2014a). Odstopanja med ocenami nastanejo zaradi obsega različnih negativnih vplivov paratuberkuloze na individualno čredo, kar je posledica različnih tehnologij rej, starosti živali, infektivne doze in prevalence bolezni (Garcia in Shalloo, 2015), po drugi strani pa so razlike delno posledica tudi različnih metodoloških pristopov ocenjevanja ekonomskega vpliva bolezni. Čeprav različne študije vključujejo modele MAP, ocen stroškov bolezni ni mogoče preprosto prenesti na drugo regijo ali v drugo časovno obdobje. Pri ocenjevanju je ključnega pomena, da pri izračunih upoštevamo pogoje reje v najširšem smislu, ki ustrezajo obravnavani regiji oziroma državi. Upoštevati je potrebno razlike v cenah inputov in outputov, časovno vrednost denarja, razlike v produkcijskih sistemih in pravni sistem države (npr. subvencije za preventivne ali kontrolne programe) (Dijkhuizen in Morris, 1997). Celovit razmislek o pomenu bolezni in odločanje o strategiji nadzora mora temeljiti na ekonomski analizi, pa tudi na neekonomskih vplivih bolezni. Poleg finančnih posledic moramo upoštevati dobrobit in zdravje živali, ponudbo in kakovost živalskih proizvodov na trgu ter njihovo hranilno vrednost, naklonjenost kmetov do tveganj, politične pristojnosti in druge morebitne vplive (Dijkhuizen in Morris, 1997). Pri paratuberkulozi je najočitnejši (trenutno še) neekonomski dejavnik, ki spodbuja raziskave in kontrolo bolezni, skrb za javno zdravje (Waddell in sod., 2016). Garcia in sod. (2015) opozarjajo, da lahko v primeru potrjene povezave med MAP in Crohnovo boleznijo pri ljudeh pričakujemo signifikantne ekonomske izgube, ki bodo najbolj prizadele mlečno industrijo.

Ukrepi v rejah, ki so proste bolezni, so usmerjeni v strogo izvajanje bio-varnostnih ukrepov, ki temeljijo na čim večji zaprtosti reje. V okuženih rejah obvladovanje temelji na treh sklopih ukrepov, in sicer:

- a) na preprečevanju novih okužb,
- b) ustreznem ukrepanju z okuženimi živalmi in
- c) povečevanju odpornosti živali proti okužbam z MAP.

Učinkovit program nadzora bi moral vključevati ugotavljanje zgodnjih okužb z MAP in zakol okuženih živali in temeljiti na spremembah pri upravljanju reje. Za obvladovanje bolezni so ključnega pomena zoohigienski ukrepi; zlasti pomembna je čistoča porodnišnice ter ločena reja telet od odraslih živali, saj moramo preprečiti stik telet z iztrebki odraslih živali. Novorojena teleta je priporočljivo napajati z mlezivom preverjeno neokuženih krav in jih nato zrediti z mlečnimi nadomestki ali s pasteriziranim mlekom. Pomembno je tudi zagotoviti ločeno rejo bolnih in zdravih živali ter ločeno pašo mladih živali za razplod in starejših živali. Pozornost je treba posvetiti tudi preprečevanju onesnaženja krme in vode z iztrebki. Literatura omenja tudi ugoden učinek kemoprofilakse, in sicer ionoforov in galija, ki zmanjšujeta verjetnost okužbe živali in izločanje MAP. V Kanadi je monenzin celo registriran za zmanjševanje izločanja MAP z iztrebki (Fecteau, 2017).

Zelo pomemben sestavni del obvladovanja paratuberkuloze je tudi ustrezno ukrepanje z okuženimi živalmi. Najbolj zaželen princip je testiranje in izločanje, vendar v rejah z visoko pojavnostjo bolezni to velikokrat ni izvedljivo zaradi prevelikih stroškov. Okužene živali je v tem primeru najprimerneje ločiti od neokuženih in potem ločeno rediti (brez fizičnega stika). Okužene živali se morajo prioritetno izločati v primeru pojava tudi drugih zdravstvenih ali reprodukcijskih težav.

Za nadzor bolezni v okuženi čredi lahko pride v poštev tudi cepljenje, ki povečuje naravno odpornost živali, vendar so mnenja o njegovi primernosti močno deljena, saj je posledično oteženo ugotavljanje bolezni, možne pa so tudi navzkrižne reakcije pri kožnem testu na govejo tuberkulozo. Cepljenje sicer v veliki meri prepreči pojav kliničnih znakov in zmanjša izločanje MAP z iztrebki in mlekom, bolezni pa ne ozdravi. Rezultati preteklih raziskav v zvezi s cepljenjem živali v dveh močno okuženih rejah v Sloveniji so pokazali, da se je po cepljenju izboljšala mlečnost živali na letni ravni (v povprečju za 600 kg na žival) in zmanjšalo izločanje MAP z iztrebki in mlekom (Ocepek in sod., 2014b). Novejše raziskave kažejo, da obstajajo tudi genetske razlike glede odpornosti živali na okužbo z MAP. V prihodnosti pričakujemo, da bo to področje predmet intenzivnih preučevanj in morebitnega razvoja genetskih testov, ki bodo razlikovali med odpornimi in manj odpornimi živalmi proti okužbi z MAP. Podrobna ekonomska analiza vplivov bolezni omogoča pridobitev ocene na kakšen način in v kakšnem obsegu je bolezen smiselno nadzirati ter do kakšnih proizvodnih s tem pa tudi dohodkovnih tveganj prihaja v nasprotnem primeru (Rushton, 2009). Ekonomsko učinkovitost kontrolnih ukrepov so preučevali z opazovalnimi kot tudi simulacijskimi študijami. Večina rezultatov kaže, da so kontrolni ukrepi ekonomsko upravičljivi, nejasno pa je kateri ukrepi so najbolj učinkoviti. Pillars in sod. (2009) so v petletni longitudinalni opazovalni študiji na šestih rejah krav molznic v Michiganu (ZDA) prišli do zaključka, da so ukrepi ekonomsko učinkoviti. Po drugi strani pa so Groenendaal in sod. (2008) v enakem času in tipu študije na 40 rejah krav molznic širom ZDA ugotovili, da je ekonomska korist mejna in še to le v primeru, da so stroški diagnostike sofinancirani s strani države. V simulacijskih študijah so si prizadevali ugotoviti predvsem, kateri ukrepi so najučinkovitejši, vendar so starejši modeli uporabljali predpostavke, ki so se kasneje izkazale za napačne; in sicer so upoštevali, da se pri vseh živalih okužba razvije v klinično fazo in s tem manjšo proizvodnjo mleka, nižjo klavno težo in druge znake ter da so okužbe starejših živali zanemarljive. Smith in sod. (2015) so razvili razredni model in dokazali, da imata lahko ti dve epidemiološki značilnosti pomembno vlogo pri dinamiki bolezni v čredi krav molznic. Kasneje pa so pokazali tudi, da so splošni kontrolni ukrepi za MAP stroškovno učinkoviti, še posebno v večjih čredah z višjo prevalenco (Smith in sod., 2017). V Sloveniji celovita ekonomska analiza vplivov paratuberkuloze in ekonomske učinkovitosti kontrolnih programov do sedaj še ni bila izvedena.

### **3 MATERIALI IN METODE**

#### **3.1 Ugotavljanje prevalence paratuberkuloze v rejah krav molznic (DS1)**

##### **3.1.1 Priprava vprašalnika in izdelava podrobnega načrta vzorčenja**

Pred vzorčenjem smo pripravili vprašalnik za rejce in izdelali podroben načrt vzorčenja. Na podlagi izpolnjenih vprašalnikov, katere smo najprej predstavili Upravnemu in Nadzornemu odboru priznane rejske organizacije za črnobelo pasmo – to je Društvu rejcev govedi črnobelega pasme v Sloveniji, ki nanj ni imel pripomb, smo pridobili osnovne epidemiološke, tehnične in ekonomske podatke o vzorčenih rejah.

### **3.1.2 Vzorčenje**

V okviru preliminarne vzorčenja smo pregledali 11 rej črnobelega pasme. Odvzeli smo dva do tri skupinske vzorce fecesa (odvisno od velikosti in sistema reje) na rejo. Na enak način smo pristopili tudi k sistematičnemu vzorčenju v rejah bikovskih mater. V eni pozitivni reji smo v okviru preliminarne raziskave vzorčili vse živali starejše od dveh let (n=67).

Prvo sistematično vzorčenje v čredah bikovskih mater v letu 2019: 188 vzorcev iz 89 rej. Drugo sistematično vzorčenje v čredah bikovskih mater v letu 2020/21: 246 vzorcev iz 118 rej. V rejah, ki so bile pozitivne v letu 2019, razen ene izjeme (na željo lastnika), v letu 2020 nismo jemali skupinskih vzorcev, ampak so bile pregledane vse živali v reji.

Podrobno smo pregledali 11 od 12 pozitivnih rej. En rejec (od devetih) je zavrnil sodelovanje, smo pa zato pregledali še tri druge reje krav molznic v katerih smo, mimo načrtnega vzorčenja, odkrili paratuberkulozo. V vsaki reji smo najprej rejcu na osnovi ogleda farme, podali priporočila za omejevanje nadaljnjih okužb v reji. Nato smo odvzeli vzorce blata in krvi vsem živalim starejših od dveh let, vzorce vode in skupinske vzorce mleka. Skupaj smo tako pregledali 1015 živali, 28 vzorcev vode in 7 vzorcev mleka.

### **3.1.3 Molekularne in bakteriološke preiskave vzorcev**

**Izolacija DNA.** Vzorcju 10 g iztrebkov smo dodali 30 ml sterilne destilirane vode in stresali 30 minut na stresalniku. Mešanico smo pustili stati 30 minut pri sobni temperaturi in nato 1 ml supernatanta odpipetirali v epruveto MagnaLyser. Preostanek vzorca smo shranili v zamrzovalniku pri temperaturi -70°C. Epruveto MagnaLyser smo centrifugirali 5 minut pri 10000×g, supernatant odlili in po potrebi ponovili korak. Iz peletov smo nato izolirali DNA z mehansko homogenizacijo (cirkonijeve/silicijeve kroglice; MagnaLyser, Roche) in uporabo komercialnega kompleta za izolacijo DNA »DNA isolation from complex samples« (Inštitut za metagenomiko in mikrobne tehnologije, d.o.o., IMMT, Slovenija), po navodilih proizvajalca.

**Pomnoževanje DNA.** Prisotnost MAP smo ugotavljali z metodo PCR v realnem času, ki smo jo v okviru preteklih raziskav razvili za pomnoževanje insercijskega zaporedja IS900 MAP na aparaturi LightCycler 2.0 (Logar in sod., 2012.) Za kvantifikacijo MAP v vzorcju smo uporabili predhodno opisani kvantitativni PCR (qPCR; Ricchi in sod., 2014) za pomnoževanje gena F57. V primeru pozitivnega rezultata molekularnega testa smo opravili še gojiščno preiskavo, da smo pridobili izolate za nadaljnje epidemiološke raziskave.

**Gojiščna preiskava.** Za gojiščno preiskavo smo 5 ml supernatanta zmešali s 25 ml 0,9 % HPC, stresali 30 minut in inkubirali 18 ur pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo vzorec koncentrirali in nasadili na dve Herroldovi jajčni gojišči HEYA z amfotericinom B, nalidiksinsko kislino, vankomicinom in mikobaktinom J (Becton Dickinson, Sparks, MD). Gojišča smo inkubirali pri 37°C vsaj 16 tednov. Zrasle kolonije smo po barvanju po Ziehl-Neelsenu pogledali pod mikroskopom ter jih identificirali s testom PCR v realnem času. Izolate smo shranili pri -70°C za nadaljnjo tipizacijo.

**Validacija testa qPCR za detekcijo in kvantifikacijo MAP.** Metodo qPCR za ugotavljanje prisotnosti MAP v preiskovanih vzorcih, ki temelji na pomnoževanju gena F57, smo validirali in umerili z digitalnim PCR (dPCR). Za ta namen smo pripravili 5-kratno redčitveno vrsto DNA izolirane iz MAP-pozitivnega

fecesa goveda, v treh bioloških ponovitvah. Vsako ponovitev smo s qPCR analizirali v treh tehničnih ponovitvah, izolirano DNA vsake biološke ponovitve pa smo kvantificirali tudi z dPCR, ki omogoča absolutno kvantifikacijo tarče v vzorcu. S primerjavo rezultatov dPCR in qPCR za vse tri biološke ponovitve smo pridobljene vrednosti testa qPCR (vrednosti Ct) lahko na podlagi pridobljene umeritvene krivulje qPCR prevedli v število MAP [CFU] na gram fecesa; ker se gen F57 vedno pojavlja v eni kopiji na genom MAP, smo pri prevajanju rezultatov upoštevali smo redčitve vzorca pri izolaciji DNA in pripravi mešanic PCR.

### 3.2 Ugotavljanje odpornosti živali na okužbo z MAP s pomočjo izbranih biokemijskih pokazateljev (DS1)

Živali z večjo odpornostjo proti okužbi smo določali z merjenjem sposobnosti vezave železa, vsebnosti vitamina D3 in skupne antioksidantne kapacitete v krvnem serumu. Primerjali smo skupino potrjeno okuženih živali (n=75) in živali, ki so v testih za ugotavljanje MAP reagirale negativno (n=75).

V vsaki reji smo izbrali pare krav za primerjavo med okuženimi (MAP pozitivnimi) in zdravimi (MAP negativnimi). V pare smo vključili primerljive krave iz posamezne reje, ki so bile v enaki fazi laktacije in enako stare ter so bile izenačene glede dnevne količine mleka v časovno najbližji mlečni kontroli. V krvnem serumu smo izmerili vsebnost vitamina D3 (VIDAS® 25 OH Vitamin D Total assay, BioMérieux, Francija) ter sposobnost vezave železa (TIBC), in skupno antioksidantno kapaciteto (TAS) z avtomatskim analizatorjem RX Daytona+ (Randox Laboratories Ltd., UK). Ugotoviti želimo ali imajo živali, ki kljub izpostavljenosti povzročitelju niso obolele, vrednosti izbranih parametrov drugačne od obolelih. Zanima nas tudi vpliv okužbe, ki največje spremembe povzroča v črevesju, na parametre v krvi, ki so indirektno povezani tudi z ustreznim delovanjem črevesja. V statistično analizo rezultatov smo vključili samo pare krav črno-bele pasme (150 krav). Podatki o izbranih parih živali so prikazani v **preglednici 1**.

**Preglednica 1.** Podatki o izbranih parih živali (srednja vrednost, min. in maks. vrednost).

<i>Krave</i>	<i>Pozitivne (n=75)</i>	<i>Negativne (n=75)</i>
Zaporedna laktacija	2,5 (1–8)	2,35 (1–6)
Dni v laktaciji	212 (11–607)	209 (23–761)
Prireja mleka (kg)/dan	29,1 (9.2–52.4)	29,7 (10.3–50.4)

Rezultate smo analizirali s statističnim programom R. Za primerjavo med skupinama smo uporabili parni t-test in Wilcoxonov test predznačenih rangov. Razlike med skupinami MAP pozitivnih živali smo analizirali s pomočjo analize variance (ANOVA) in Kruskal-Wallisovega testa ter s Tukey HSD ali parnim Wilcoxonovim post-hoc testom. S pomočjo izračuna korelacij po Spearmanu smo ocenili korelacije med PCR (Ct) vrednostmi, vrednostmi ELISA (Quiagen) testa in rezultati biokemijskih preiskav.

### 3.3 Ugotavljanje epidemioloških povezav pozitivnih rej (DS1)

Z analizo omrežja smo preučili strukturo premikov goveda v Sloveniji in ovrednotili potencial za širjenje MAP na časovnem omrežju. Podatke o premikih govedi smo pridobili z Uprave Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (UVHVVR). Izvedli smo statično in časovno analizo omrežja premikov govedi. V analizo smo vključili podatke o premikih od 1. 8. 2011 do 31. 7. 2016. Vozlišča v omrežju predstavljajo gospodarstva različnega tipa, povezava pa premik vsaj ene živali iz enega vozlišča

v drugo. Vozlišče je bilo kmetijsko gospodarstvo, pašnik, klavnica, obrat za predelavo živalskih odpadkov ali sejem. Ker so nas zanimali premiki, ki so epidemiološko pomembni za širjenje bolezni, smo izločili vse premike na gospodarstva, ki so ustrezala končnim vozliščem oziroma krajiščem; to so bile klavnice, zbiralnice trupel in kafilerija.

Mesečna in letna statična omrežja smo generirali in analizirali z uporabo programske opreme Pajek (Batagelj in Mrvar). Ciljno usmerjeno odstranjevanje vozlišč za ugotavljanje uporabljanja mer središčnosti za ciljne ukrepe, pa smo izvedli z uporabo programskega jezika R (R Development Core Team) in paketa *igraph*. Poleg tega smo s pomočjo programskega jezika Python (Python Software Foundation) pripravili model širjenja MAP na časovnem omrežju s tako imenovanim SI modelom (angl. *susceptible-infectious*; dovzeten-inficiran).

Za podrobno analizo premikov govedu v in iz rej, ki so bile pozitivne na MAP, smo ponovno pridobili podatke o vseh premikih govedu v Sloveniji med 1. 1. 2006 in 20. 5. 2021, da smo v analizo vključili najnovejše podatke. Ponovno smo izvedli statično in časovno analizo omrežja s programom Pajek, v analizo pa smo zaradi počasnega poteka bolezni vključili podatke za zadnjih 10 let.

### **3.4 Ukrepi v pozitivnih rejah (DS2)**

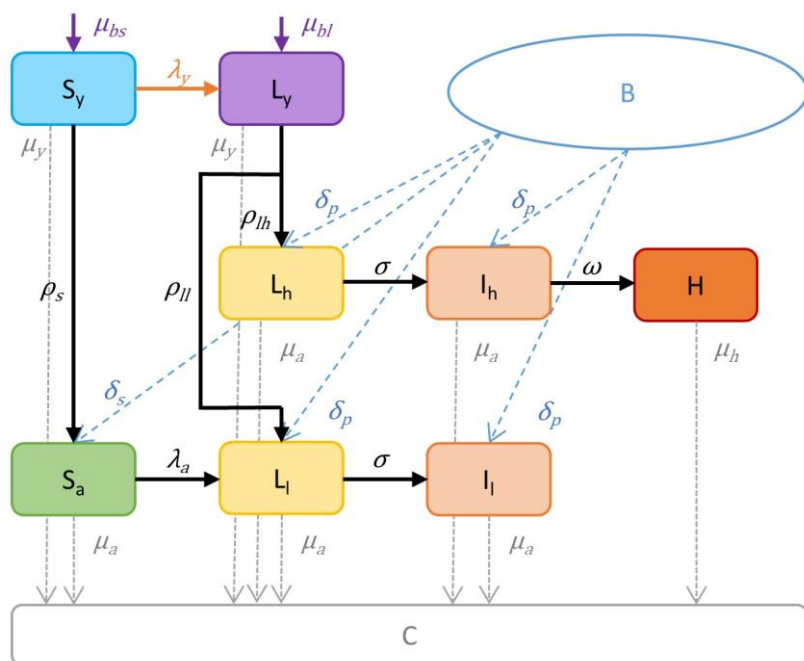
#### **3.4.1 Ugotavljanje razširjenosti v reji**

V primeru pozitivnih rezultatov preiskav smo se z lastnikom živali dogovorili za obisk reje. Med obiskom smo pridobili informacije o zdravstvenem stanju živali in dodatne epidemiološke podatke. Zanimali so nas predvsem podatki o krmnem obroku, postopku krmljenja, telitvah in vzreji telet, ureditvi in čiščenju hleva ipd. Ob tem smo rejca seznanili z boleznijo in mu predstavili splošne ukrepe za nadzor bolezni, ki so na voljo tudi v pisni obliki. Z dodatnim vzorčenjem različnih kategorij živali (npr. visoko brejih plemenskih telic, krav molznic) in okolja smo pridobili podatke o razširjenosti bolezni v reji.

#### **3.4.2 Modeliranje prevalece na ravni črede**

Poleg tega smo za ugotavljanje razširjenosti paratuberkuloze v tipični slovenski čredi krav molznic razvili stohastični razredni model širjenja MAP. Model je bil razvit v programu EMULSION (angl. *Epidemiological Multi-Level Simulation Framework*), ki temelji na uporabi končnih avtomatov. Razredi predstavljajo različna zdravstvena stanja, ki opisujejo potek bolezni. Modelirali smo dva načina poteka okužbe in sicer pot nizkih in visokih izločevalk. Odrasle krave molznice smo razdelili v šest razredov; enega za dovzetne krave in pet za različne stadije okužbe. Stadiji okužbe so bili latentno okužena in okužena krava na poti nizkih in visokih izločevalk ter klinično obolele krave, ki so zadnji stadij na poti visokih izločevalk. Shema modela je prikazana na **sliki 1**. Dodali smo razrede za mlade dovzetne in latentne živali, za izločene živali in za vnos novih živali v čredo. Modelirali smo vertikalni in horizontalni prenos MAP ter možnost ponovne okužbe ali spontane eliminacije bolezni iz črede s premiki živali. Vse vrednosti parametrov so bile deterministične, vendar so bile stopnje samodejno pretvorjene v verjetnosti, s čimer je bila vpeljana stohastičnost. Parametri, ki opisujejo strukturo črede in demografijo, so bili ocenjeni na podlagi slovenskih podatkov iz leta 2018, ki smo jih pridobili s Kmetijskega inštituta Slovenije (KIS) in Statističnega urada Republike Slovenije (SURs). Parametri glede epidemioloških značilnosti MAP so bili pridobljeni iz objavljene literature. Nekateri vrednosti smo prilagodili na podlagi strokovnega mnenja in kalibracije modela, katere namen je bil zagotoviti stabilnost velikosti črede. Okužba se je začela z vnosom ene okužene živali v čredo, prosto

paratuberkuloze. Širjenje MAP znotraj črede smo z dnevnim časovnim korakom simulirali 10 let in s 1.000 ponovitvami. Izvedli smo notranjo validacijo modela in analizo občutljivosti za epidemiološko najpomembnejše parametre.



**Slika 1.** Diagram modela za širjenje (MAP) v tipični slovenski čredi krav molznic. Možna zdravstvena stanja, ki jih predstavljajo razredi, so dovzetne mlade živali ( $S_y$ ); latentne mlade živali ( $L_y$ ); latentne krave ( $L_h$ ), okužene krave ( $I_h$ ) in krave z visokim izločanjem ( $H$ ) na poti z visokim izločanjem; dovzetne krave ( $S_a$ ); latentne krave ( $L_l$ ) in okužene krave ( $I_l$ ) na poti nizkega izločanja; ter izločene, mrtve ali prodane živali ( $C$ ). Razred za kupljene živali ( $B$ ) predstavlja živali izven črede, ki jih je mogoče vključiti v čredo. Puščice predstavljajo, kako posamezne živali napredujejo iz enega zdravstvenega stanja v drugega. Parametri in izračuni so prikazani v Knific in sod., 2022a.

### 3.4.3 Izdelava individualnih predlogov za nadzor bolezni v posameznih rejah

Individualne predloge za nadzor bolezni v posameznih rejah smo prilagodili ugotovljeni prevalenci MAP v čredi, finančnim zmožnostim rejca ter prostorskim možnostim za izvedbo biovarnostnih in drugih ukrepov na gospodarstvu. Režim v rejah z nizko prevalenco (<5 %) je obsegal testiranje (predvidoma skupinskih) vzorcev iztrebkov goveda vsaj enkrat ali dvakrat letno in izločitev pozitivnih živali ter uvedbo zunanjih in notranjih biovarnostnih ukrepov. To pomeni izločitev živali, ki izločajo bakterije, ureditev porodnišnice ali individualnih porodnih boksov in razkuževanje po vsaki telitvi, takojšnja ločitev teleta od matere po telitvi in napajanje telet z mlezivom potrjeno MAP negativnih krav, vzreja telet za pleme ločeno od krav, napajanje s pasteriziranim mlekom ali mlečnim nadomestkom, redno čiščenje napajalnikov in odstranjevanje ostankov krme s krmilne mize (izvedba krmilne mize in napajalnikov na način, da se čim bolj onemogoči kontaminacija z iztrebki), karantena za kupljene živali ali nakup živali le iz negativnih rej in ukinitev skupne paše.

V rejah z visoko prevalenco (>5 %) smo predlagali serološko testiranje (individualni vzorci mleka ali krvi) in ločevanje živali ter uvedbo zunanjih in notranjih biovarnostnih ukrepov, kar je pomenilo izločitev živali, ki izločajo bakterije, ločeno rejo seropozitivnih živali, ki niso bile izločene, in

seronegativnih živali, ob pojavu zdravstvenih ali reprodukcijskih težav prednostno izločanje seropozitivnih živali, ureditev porodnišnice ali individualnih porodnih boksov in razkuževanje po vsaki telitvi, takojšnje ločitev teleta od matere po telitvi in napajanje telet z mlezivom potrjeno MAP-negativnih krav, vzreja telet za pleme ločeno od krav, napajanje s pasteriziranim mlekom ali mlečnim nadomestkom, redno čiščenje napajalnikov in odstranjevanje ostankov krme s krmilne mize (izvedba krmilne mize in napajalnikov na način, da se čim bolj onemogoči kontaminacija z iztrebki), karanteno za kupljene živali ali nakup živali le iz negativnih rej, ukinitve skupne paše in prepoved sodelovanja živali na razstavah in drugih prireditvah.

### **3.5 Izdelava ocene ekonomskega vpliva bolezni (DS3)**

Zaradi pomanjkanja empiričnih podatkov o posameznih učinkih bolezni, premalo zanesljivih testov za diagnosticiranje okužb z MAP ter na podatke vezanih negotovosti in neznank eksaktnega kvantitativnega ekonomskega vpliva paratuberkuloze ni mogoče določiti. Za izdelavo ocene ekonomskega vpliva bolezni smo se zato poslužili stohastičnega modeliranja. Modeliranje je omogočilo uporabo v tem projektu zbranih podatkov in uporabo v drugih raziskavah objavljenih informacij.

#### **3.5.1 Izdelava bio-ekonomskega modela reje**

Bio-ekonomski model na ravni krave molznice smo razvili na podlagi podatkov o strukturi kmetijskih gospodarstev, demografskih podatkov o govedoreji ter proizvodnih parametrov ter odkupnih cen v Sloveniji za leto 2020. Podatke smo pridobili iz Kmetijskega inštituta Slovenije, Gospodarske zbornice Slovenije, Agencije RS za kmetijske trge in razvoj podeželja, Statističnega urada RS, Evropskega statističnega urada, Kataloga kalkulacij za načrtovanje gospodarjenja na kmetijah v Sloveniji (Jerič in sod., 2011) in Skrajšane oblike kalkulacij, prirejenih za prijavo na javni razpis v okviru PRP 2014-2020 za leto 2020 (priloga 2 Uredbe o spremembah in dopolnitvah Uredbe o izvajanju podukrepa pomoč za zagon dejavnosti za mlade kmete iz Programa razvoja podeželja Republike Slovenije za obdobje 2014–2020). Model, ki odraža stanje v tipični reji krav molznic pri nas, smo razvili v programu Microsoft Excel s pomočjo dodatka @RISK, verzija 8.3.2 (Palisade Corporation, Newfield, New York, ZDA).

Predpostavki osnovnega modela na ravni dovezetne krave sta, da paratuberkuloza v čredi ni prisotna in da se preventivni ukrepi ne izvajajo. V model so vključeni proizvodni in reprodukcijski parametri ter pojav navadno prisotnih zdravstvenih težav (mastitis, abortus, zaostala placent) in z njimi povezane nižje mlečnosti in višjih veterinarskih stroškov, s pomočjo katerih smo izračunali celotni prihodek, spremenljive stroške in pokritje. Spremenljivke so v model vključene kot deterministične ali stohastične glede na dostopnost podatkov in relevantnost spremenljivke za izid modela. V izračunu smo se omejili na postavke, ki so vezane na živali, ne pa tudi na subvencije, stroške financiranja in amortizacijo. Celotni prihodek predstavljajo prihodki od prodaje mleka, mesa prodanih telet in mesa izločenih krav. Spremenljivi stroški so zajemali stroške obnove črede, mleka za teleta, vse krme, druge materialne stroške ter stroške osemenitev, veterinarskih storitev in zdravil ter zavarovanje živali. Za oceno prihodkov, stroškov in pokritja na ravni črede je iz porazdelitve podatkov rezultatov na ravni živali vzorčeno 18 živali, kar je bila povprečna velikost črede krav molznic v letu 2020.



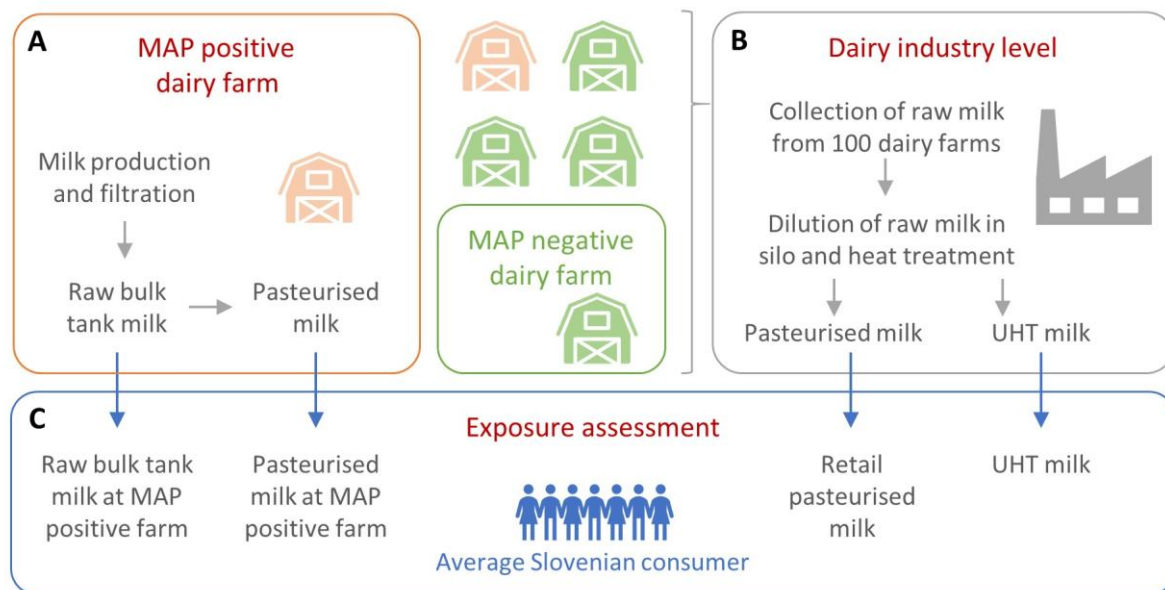
### **3.5.2 Bio-ekonomski model vpliva paratuberkuloze**

Podatke o učinku paratuberkuloze na proizvodnjo, reprodukcijo in pojavnost mastitisa, abortusa in zaostale placente smo pridobili iz literature. Ker so ti ocenjeni za področje, na katero se študija nanaša in ker so ocene večinoma podane za večje črede, kot so pri nas, smo nekatere podatke prilagodili s pomočjo ekspertnih ocen. Posamezni učinki bolezni so vključeni na ravni živali kot deterministične vrednosti ali z verjetnostnimi porazdelitvami. Negotovost je v model vključena preko verjetnostnih porazdelitev vhodnih spremenljivk, ki predstavljajo možna stanja glede vplivov paratuberkuloze na ravni živali. Pri proizvodnih izgubah smo vključili znižano proizvodnjo mleka, znižano težo telet in izločenih krav ter izgubo prihodka v primeru pogina ali evtanazije klinično bolne živali. Pri neposrednih stroških bolezni pa smo vključili dodatne stroške zdravljenja, višje stroške obnove črede, zaradi predčasnega izločanja živali iz črede, višje stroške osemenitve. Upoštevali pa smo tudi znižanje porabe močnih krmil ob znižani mlečnosti.

Ker se bolezen razvija počasi, smo uporabili časovni korak enega leta. Pripravili smo tri pod-modele glede na zdravstveno stanje živali, in sicer za MAP negativne živali in dva za okužene živali; za subklinično in klinično okužene živali. Vsi pod-modeli so predstavljali posamezno simulacijo na ravni živali v obdobju enega leta, ki smo jih za preučitev ekonomskega vpliva bolezni združili in simulirali na ravni črede. Vpliv paratuberkuloze na ravni črede se sešteje glede na simulirano število MAP negativnih živali ter klinično in subklinično obolelih živali. Prevalenca bolezni znotraj črede temelji na rezultatih razrednega modela širjenja MAP v čredi v Sloveniji in ekonomskih kalkulacijah na podlagi velikosti črede in intenzivnosti proizvodnje, ki odraža tipično rejo krav molznic v Sloveniji v letu 2020. S pomočjo metode vzorčenja z latinskimi hiperkockami smo izvedli 10.000 ponovitev simulacij Monte Carlo. Opravili smo notranjo validacijo modela in analizo občutljivosti.

### **3.5.3 Izpostavljenost slovenskega potrošnika bakteriji MAP v mleku**

Poleg proizvodnih in reprodukcijskih parametrov smo na ravni črede modelirali tudi podatke o neposrednem izločanju MAP v mleko in o posredni kontaminaciji mleka s kontaminiranimi iztrebki. Tako smo razvili stohastični model za oceno potencialne izpostavljenosti slovenskega potrošnika bakteriji MAP preko mleka in mlečnih izdelkov. Uporabili smo Microsoft Excel in programom @RISK. Kontaminacijo surovega in pasteriziranega polnomastnega mleka ter možno izpostavljenost ljudi smo modelirali na ravni kmetije in na ravni mlečne industrije. Na **sliki 2** je prikazana shema modela, ki je sestavljen iz treh podmodelov. Podmodel na ravni kmetije (**slika 2A**), kjer je simulirana neposredna in posredna kontaminacija mleka z bakterijami MAP, mešanje mleka v cisterni na kmetiji ter redukcija števila bakterij zaradi filtriranja mleka. V reji prosti paratuberkuloze smo simulirali samo količino proizvedenega mleka, ki je bil v mlekarni zmešan z mlekom iz pozitivnih rej, kar je podmodel na ravni mlečne industrije (**slika 2B**). Na obeh ravneh smo modelirali tudi znižanje koncentracije bakterij v mleku s pasterizacijo mleka. Za UHT mlek smo na podlagi literature in privzete predpostavke, da ne pride do navzkrižne kontaminacije, predvideli popolno eliminacijo MAP iz mleka. Podmodel potencialne izpostavljenosti ljudi (**slika 2C**) služi za modeliranje potencialne izpostavljenosti ljudi glede na proizvodnjo in porabo različnih tipov mleka v Sloveniji.



**Slika 2.** Shema strukture modela za kvantitativno oceno tveganja izpostavljenosti MAP preko različnih vrst mleka za slovenskega potrošnika. Model je sestavljen iz treh delov: (A) podmodela na ravni kmetije, (B) podmodela na ravni mlečne industrije in (C) podmodela potencialne izpostavljenosti ljudi. Parametri in izračuni so prikazani v Knific in sod., 2022b.

V tem modelu smo uporabili rezultate modela o možnem širjenju MAP na časovnem omrežju premikov govedi in rezultate širjenja MAP v tipični čredi v Sloveniji. Poleg tega smo uporabili podatke pridobljene iz zgoraj naštetih slovenskih baz podatkov, ki so se nanašali na leto 2018, podatke iz literature ter informacije pridobljene preko strokovnega mnenja. Rezultatom naših prejšnjih modelov, smo prilagodili verjetnostne porazdelitve, ki smo jih izbrali na podlagi najnižje vrednosti Akaike informacijskega merila. Verjetnostne porazdelitve o zmanjšani prireji mleka, kontaminaciji z MAP in učinkovitosti mlečnega filtra, smo ocenili na podlagi literature in strokovnega mnenja. Če je model simuliral majhno čredo, smo delež klinično in subklinično okuženih krav v čredi izračunali na podlagi rezultatov našega razrednega modela, v nasprotnem primeru pa smo uporabili porazdelitev na podlagi objavljenih podatkov. Mejna vrednost za majhno čredo, ki smo jo postavili na podlagi mnenja strokovnjaka, je bila 50 krav molznic. Zbiranje mleka v mlekarnah smo modelirali s 100 modeli na ravni kmetijskega gospodarstva in treh scenarijev prevalence MAP na ravni čred, ki so temeljili na modelu širjenja MAP na časovnem omrežju z izključenim najslabšim scenarijem. S pomočjo metode vzorčenja z latinskimi hiperkockami smo izvedli 10.000 ponovitev simulacij Monte Carlo. Poleg tega smo opravili analizo občutljivosti in preizkusili različne mejne vrednosti za majhno čredo.

### 3.6 Izdelava predloga za certificiranje rej (DS4)

Pri izdelavi predloga smo upoštevali ugotovljeno prevalenco bolezni v Sloveniji, ugotovljene stopnje okuženosti znotraj rej, epidemiološke podatke, omejitve diagnostičnih testov in pripravljenost rejcev za nadzor bolezni. Predvidevamo, da bodo reje uvrščene v 5 kategorij:

1. pozitivne reje (status E) (so reje, kjer se vsaj pri eni živali dokaže povzročitelj ali protitelesa proti MAP) oziroma reje, katerih zdravstveni status glede paratuberkuloze je nepoznan;

2. reje vključene v program monitorniga (status D), ki so imele v dveh zaporednih letih oba skupinska vzorca fecesa negativna in pri katerih njihove živali na noben način niso prišle v stik z živalmi iz rej z nižjim statusom;
3. reje vključene v program monitoringa (status C), ki so imele vzorce fecesa vseh živali starejših od dveh let negativne in pri katerih njihove živali na noben način niso prišle v stik z živalmi iz rej z nižjim statusom;
4. reje vključene v program monitoringa (status B), ki so imele vzorce fecesa vseh živali starejših od dveh let negativne dve leti zapored in pri katerih njihove živali na noben način niso prišle v stik z živalmi iz rej z nižjim statusom;
5. reje vključene v program monitoringa (status A), ki so imele vzorce fecesa vseh živali starejših od dveh let negativne tri leta zapored in pri katerih njihove živali na noben način niso prišle v stik z živalmi iz rej z nižjim statusom.

Rejam v 5. skupini se prizna status »reja prosta paratuberkuloze«. Skupaj z Upravo za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin se pripravi Pravilnik o pogojih za pridobitev in vzdrževanje statusa reje proste paratuberkuloze, ki bi se uvedel na ravni države.

## 4 REZULTATI

### 4.1 Ugotavljanje prevalence paratuberkuloze

#### 4.1.1 Rezultati prelimenarnega vzorčenja

V preliminarnem vzorčenju smo pregledali 11 rej, kjer so opazili potencialne klinične znake paratuberkuloze. Štiri reje so bile v testu PCR skupinskih vzorcev blata pozitivne na MAP.

#### 4.1.2 Rezultati skupinskih vzorcev

V letu 2019 je bilo z metodo PCR v realnem času (qPCR) pregledanih 186 skupinskih vzorcev blata odvzetih v 89 rejah, v letu 2020 pa 246 vzorcev odvzetih v 118 rejah. Skupno je bilo tako v dveh letih pregledanih 432 skupinskih vzorcev blata, odvzetih v 122 rejah. Dvakrat je bilo pregledanih 88 rej. V rejah, ki so bile pozitivne v letu 2019, razen ene izjeme (na željo lastnika), nismo jemali skupinskih vzorcev, ampak so bile pregledane vse živali v reji. Rezultate skupinskega vzorčenja v rejah prikazujemo v **preglednici 2**. Preiskava skupinskih vzorcev v dveh zaporednih letih je podvojila število pozitivnih rej.

**Preglednica 2.** Rezultati skupinskih vzorcev.

<i>leto vzorčenja</i>	<i>št. rej</i>	<i>pozitivne</i>	<i>%</i>
2019	89	4	4,49
2020	118	5	4,24
skupaj	122	8	6,56
Dvakrat gledano	88	8	9,09

#### 4.1.3 Validacija testa qPCR

Umeritvena krivulja testa qPCR, ki smo jo umerili s podatki metode dPCR, je omogočila izračun mejnih vrednosti testa qPCR v absolutnih številkah: meja detekcije testa (LOD, angl. *limit of detection*) je bila 300 bakterij MAP na gram fecesa, meja kvantifikacije testa (LOQ, angl. *limit of quantification*) pa 892 bakterij MAP na gram fecesa. Med kalibracijo in umerjanjem pridobljena parametra LOD in LOQ kažeta na dobre lastnosti testa qPCR. Učinkovitost metode qPCR, ki je bila glede na umeritveno krivuljo 96,6 %, kaže na odsotnost vpliva inhibitorjev na pomnoževanje tarčne DNA.

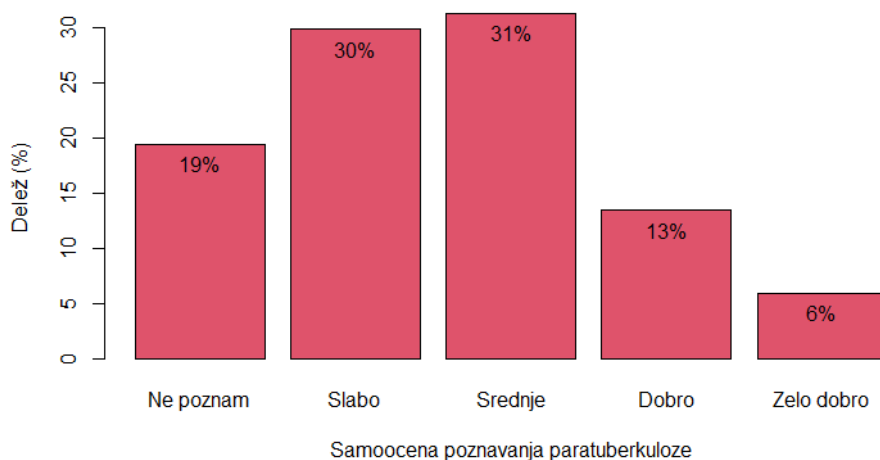
#### 4.1.4 Analiza vprašalnikov

Na vprašalnik je skupno odgovorilo 75 rejcev. Namen vprašalnika je bil, da bi primerjali vse zbrane dejavnike med MAP negativnimi in MAP pozitivnimi čredami. Večina anketirancev je želela ostati anonimna, zato taka primerjava ni mogoča, ker se je samo en rejec s pozitivno čredo strinjal z uporabo njegovih podatkov. Analize vprašanj o morebitnih dejavnikih tveganja za pojav paratuberkuloze zato ne navajamo. Prikazana je analiza osnovnih značilnosti reje, ki služi opisu obravnavane populacije.

Anketirani rejci so v redili od 9 do 120 krav, v povprečju 60 krav. Skupno so imeli na gospodarstvu v povprečju 122 glav goved, najmanj pa 14 do največ 300 glav. Večina (95 %) jih je govedorejo navedla za primarno dejavnost. Na gospodarstvu so redili tudi druge živali in sicer 22 % kokoši, 14 % prašiče, 4 % konje ter po 1 % ovce in koze. 66 rej je sodilo v konvencionalno, 8 pa v integrirano vrsto kmetovanja.

Namen reje je bil v 58 % prireja mleka za prodajo v mlekarno, 14 % vzreja plemenskih telic, 10 % reja govejih pitancev, 9 % prireja mleka za prodajo svežega mleka doma, 3 % pa jih je navedlo prirejo mleka za prodajo na mlekomatih. Povprečna mlečnost je bila 9.617 kg mleka na leto s SD 4.139 kg mleka. Več kot polovica je redila črno-belo pasmo (57 %), 12 % rdečo holštajn, 11 % križanke, po 9 % rjavo in lisasto ter 1 % limuzin. Večina redi govedo ločeno od drugih živali na gospodarstvu (88 %).

Na **sliki 3** so prikazani odgovori rejcev na vprašanje kako dobro poznajo bolezen imenovano paratuberkuloza.



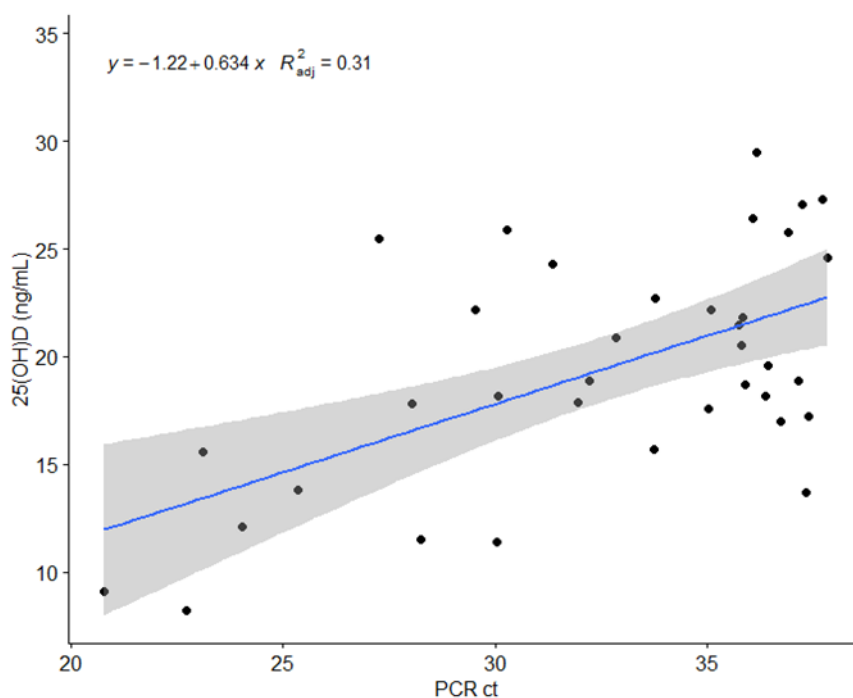
**Slika 3.** Odgovori rejcev na vprašanje, kako dobro poznajo bolezen imenovano paratuberkuloza.

#### 4.2 Ugotavljanje odpornosti živali na okužbo z MAP s pomočjo izbranih biokemijskih pokazateljev

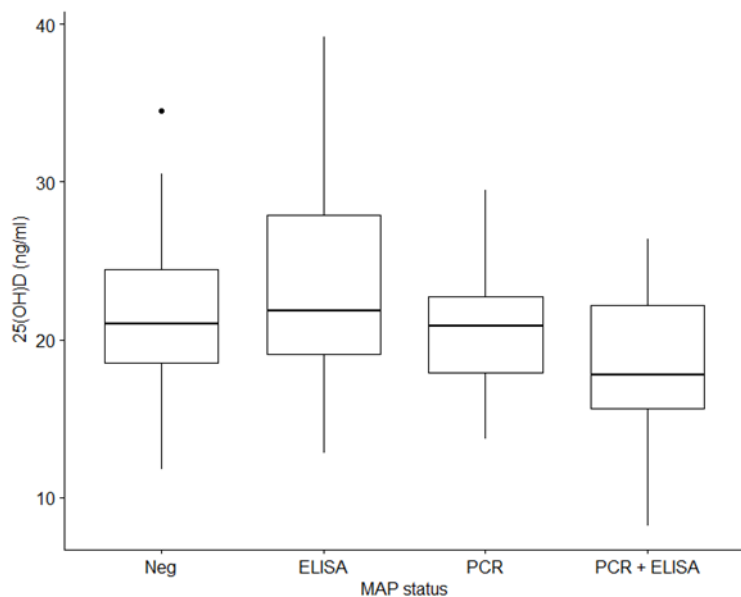
Pri zdravih kravah smo ugotovili statistično značilno višjo vrednost TAS v primerjavi z okuženimi, vrednosti vitamina D3 in TIBC pa se nista statistično značilno razlikovali med skupinama. Ugotovili smo statistično značilno pozitivno korelacijo med koncentracijo vitamina D3 in vrednostjo PCR ct ( $p=0,003$ ), med vrednostjo TIBC in PCR ct ( $p=0,01$ ) ter med vrednostjo TAS in PCR ct ( $p=0,001$ ). Rezultati kažejo, da so imele krave, ki so bile hkrati PCR in sero-pozitivne najnižje vrednosti vitamina D3, TAS, TIBC in dnevno mlečnost. Naše ugotovitve kažejo, da se pri živalih, ki izločajo več bakterij (MAP) rezultati preiskovanih biokemijskih parametrov slabšajo, kar pripisujemo vplivom bolezni. Rezultati biokemijskih preiskav pri okuženih in zdravih živalih (srednja vrednost, min. in maks. vrednost) so prikazani v preglednicah 3 do 6 in slikah 4 do 9.

**Preglednica 3.** Rezultati biokemijskih preiskav pri okuženih in zdravih živalih (srednja vrednost, min. in maks. vrednost).

Parameter	Pozitivne (n=75)	Negativne (n=75)
Vitamin D3 (ng/mL)	20,94 (8,2–39,2)	21,52 (11,8–34,5)
TIBC ( $\mu\text{g/dl}$ )	328,5 (178,5–428,1)	325,9 (193,7–419,6)
TAS (mmol/L)	1,11 (0,57–1,5)	1,17 (0,73–1,56)



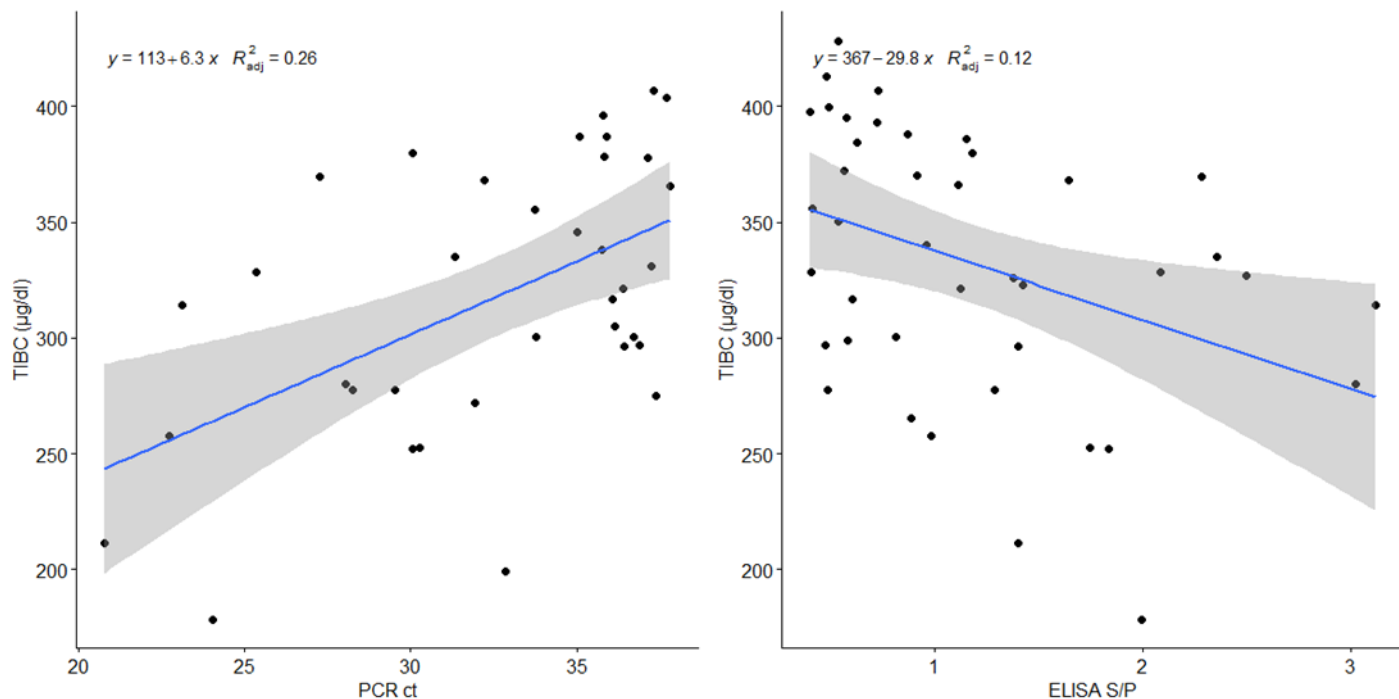
**Slika 4.** Prikaz korelacij med vsebnostjo vitamina D3 in vrednostjo Ct pri testu qPCR.



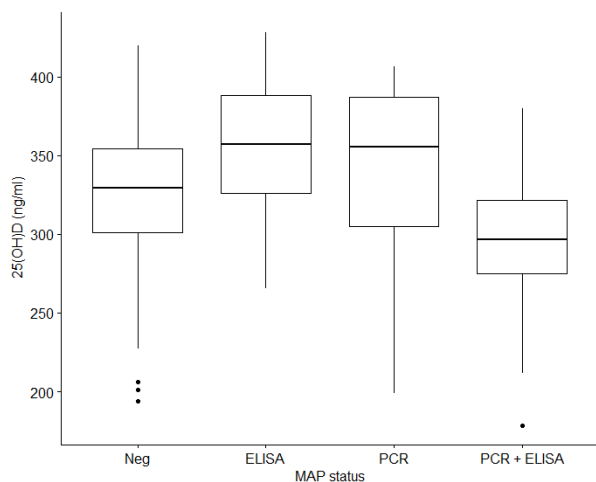
**Slika 5.** Prikaz vsebnosti vitamina D3 pri skupinah krav glede na status okuženosti z MAP.

**Preglednica 4.** Vsebnost vitamina D3 pri skupinah krav glede na status okuženosti z MAP.

Status MAP	25(OH)D (ng/mL)
Pozitivne (n=75)	20,94 (8,2–39,2)
ELISA in PCR pozit. (n=29)	18,23 (8,2–26,4)
ELISA pozit. (n=29)	23,58 (12,8–39,2)
PCR pozit. (n=17)	21,05 (13,7–29,5)
Negativne (n=75)	21,52 (11,8–34,5)



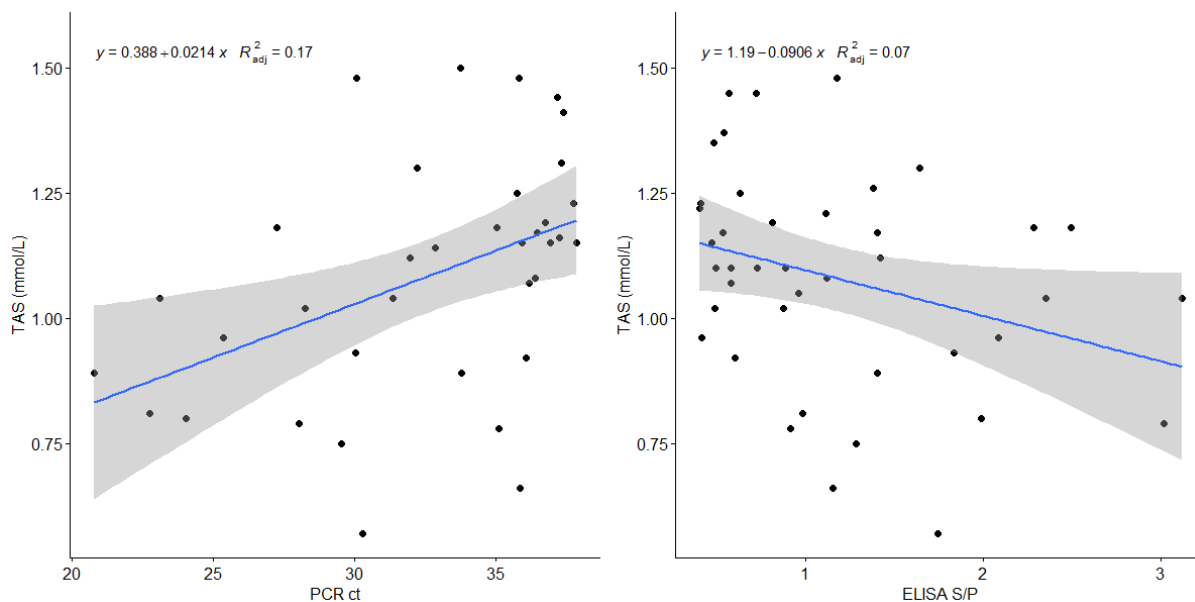
**Slika 6.** Prikaz korelacij med vrednostjo TIBC in okuženostjo z MAP.



**Slika 7.** Prikaz vrednosti TIBC pri skupinah krav glede na status okuženosti z MAP.

**Preglednica 5.** Vrednost TIBC pri skupinah krav glede na status okuženosti z MAP.

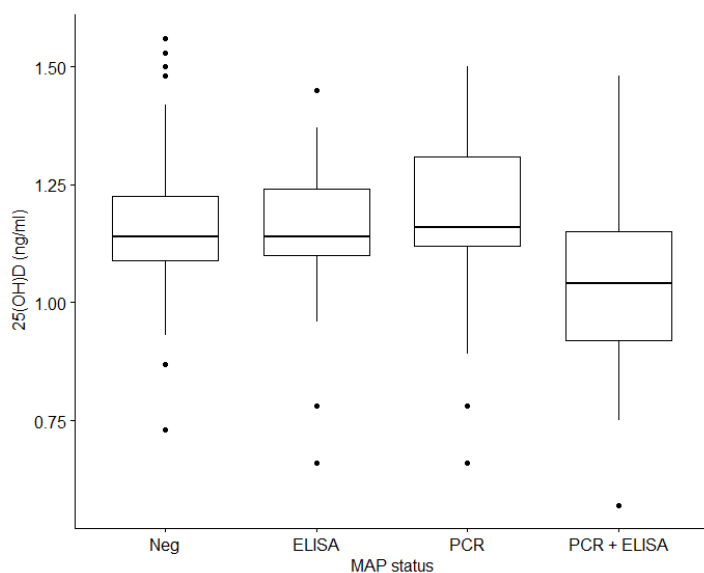
Status MAP	TIBC ( $\mu\text{g/dL}$ )
Pozitivne (n=75)	328,5 (178,5–428,1)
ELISA in PCR pozit. (n=29)	294,7 (178,5–379,7)
ELISA pozit. (n=29)	354,1 (265,2–428,1)
PCR pozit. (n=17)	342,6 (199,2–406,6)
Negativne (n=75)	325,9 (193,7–419,6)



**Slika 8.** Prikaz korelacij med vrednostjo TAS in okuženostjo z MAP.

**Preglednica 6.** Vrednost TAS pri skupinah krav glede na status okuženosti z MAP.

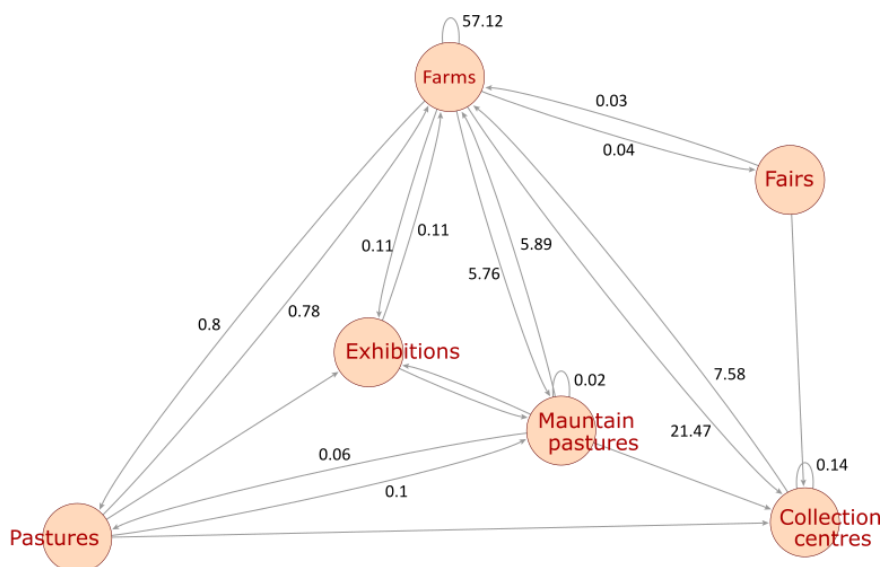
Status MAP	TAS (mmol/L)
Pozitivne (n=75)	1,0107 (0,57–1,5)
ELISA in PCR pozit. (n=29)	1,025 (0,57–1,48)
ELISA pozit. (n=29)	1,15 (0,66–1,45)
PCR pozit. (n=17)	1,172 (0,66–1,5)
Negativne (n=75)	1,167 (0,73–1,56)

**Slika 9.** Prikaz vrednosti TAS pri skupinah krav glede na status okuženosti z MAP.

### 4.3 Ugotavljanje epidemioloških povezav pozitivnih rej

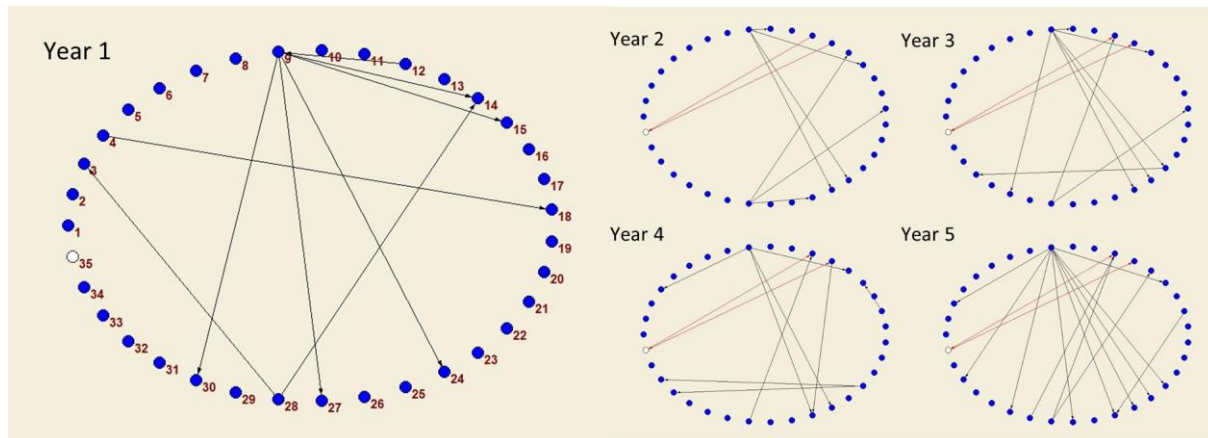
V poglobljeni analizi omrežja med avgustom 2011 in julijem 2016, je bilo skupno v premike govedi vključenih 37.138 gospodarstev. Posamezno govedo je bilo v premiku do 28-krat; večina (97,4 %) do trikrat. Več kot polovica vseh premikov je ustvarila neposreden stik med kmetijskimi gospodarstvi, skoraj tretjina pa je šla skozi zbirne centre (**slika 10**).





**Slika 10.** Graf agregiranih premikov med različnimi tipi gospodarstev. Vozlišče predstavlja en tip gospodarstva, povezava pa usmerjene premike med dvema tipoma. Oteži na povezavah so deleži usmerjenih premikov med dvema tipoma v celotnem omrežju.

Kljub temu, da so bile osnovne lastnosti letnih omrežij in mere povezanosti med leti primerljive, se je izkazalo, da se povezave med posameznimi gospodarstvi lahko precej razlikujejo. Na **sliki 11** prikazujemo skupino kmetijskih gospodarstev in pašnik in spremembe v njihovi povezanosti v opazovanih letih. Vse mere in primerjave na letnih omrežjih so natančno opisane v Knific in sod. 2020.



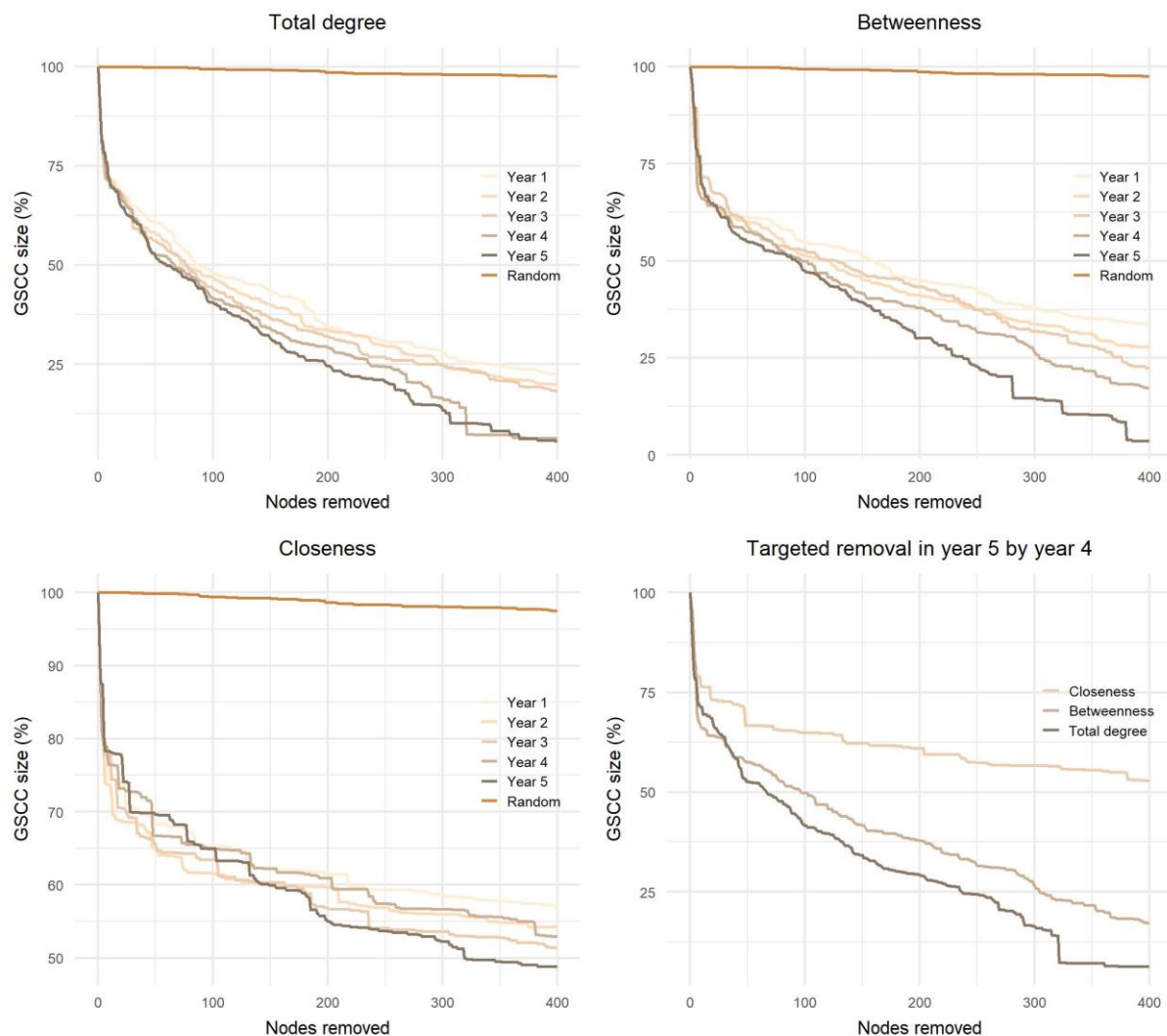
**Slika 11.** Grafi premikov goveda na letnih omrežjih v klastru povezanih gospodarstev v Bovcu. Modra vozlišča so kmetijska gospodarstva, belo vozlišče pa predstavlja pašnik.

V mesečnih omrežjih je bil očiten sezonski vzorec premikov, kar je posledica pašne dobe (**slika 12**). V letnih omrežjih je zgornjih 30 % gospodarstev opravilo 80 % vseh premikov.



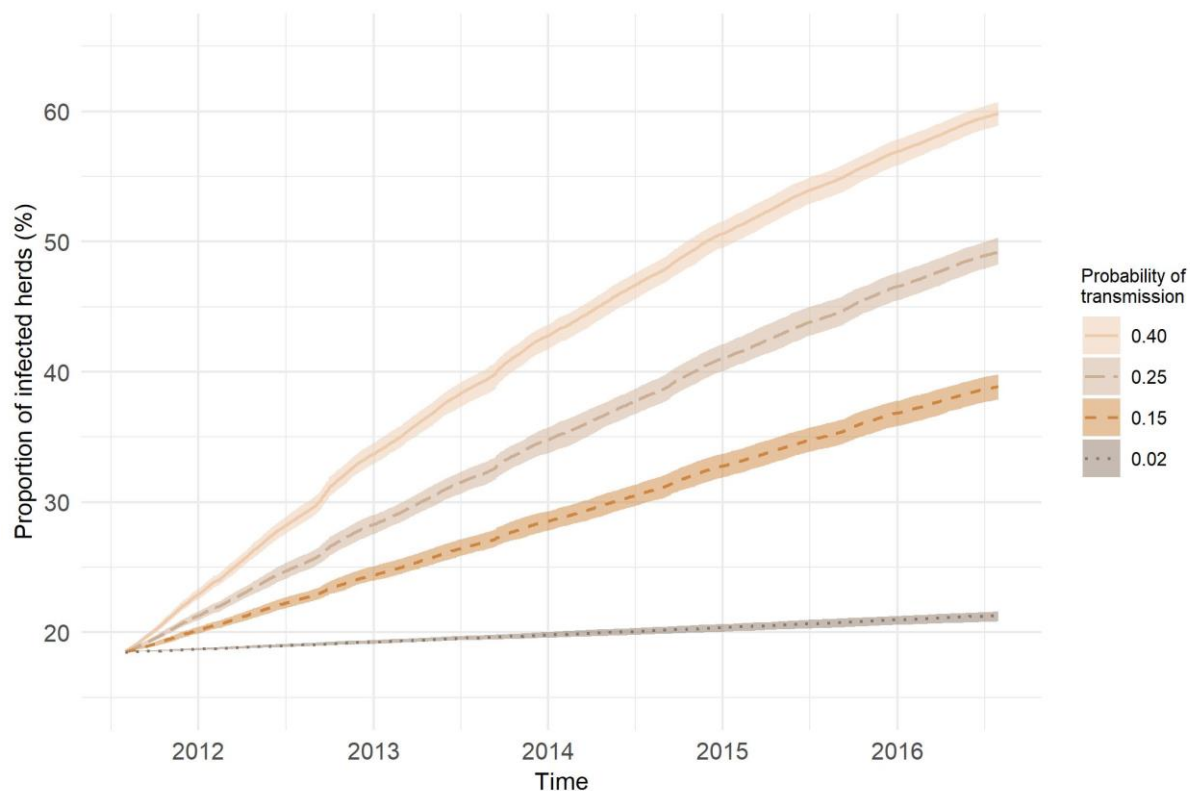
**Slika 12.** Število premikov živali po mesecih od 1. 8. 2011 do 31. 7. 2016. (A) Število premikov goved v Sloveniji brez premikov v končna vozlišča, (B) število uvoženih goved za nadaljnjo rejo in (C) število izvoženih govedo, vključno s premiki do končnih vozlišč.

Kljub temu da so bile mere središčnosti in pomembnosti med leti primerljive, pa so se povezave med gospodarstvi iz leta v leto nekoliko spreminjale. Pomembnost posameznega gospodarstva za povezanost omrežja je bila zelo heterogena. Najvplivnejša gospodarstva v omrežju so bili zbirni centri, planinski pašniki in pašniki. Pri razčlenjevanju omrežja je bilo ciljano odstranjevanje vozlišč, razvrščenih glede na vrednosti mer pomembnosti in središčnosti iz prejšnjih let, bistveno učinkovitejše kot naključno odstranjevanje vozlišč (slika 13).



**Slika 13.** Ciljna odstranitev vozlišč v petem letnem omrežju na podlagi (A) skupne stopnje, (B) vmesnost in (C) središčnost od prvega do zadnjega proučevanega leta in (D) primerjava učinkovitosti med temi tremi merami središčnosti v četrtem letu. Učinkovitost se spremlja na podlagi razpada velike močno povezane komponente (angl. *giant strongly connected component* - GSCC).

Z modeliranjem širjenja MAP na časovnem omrežju smo zajeli vzročno dostopnost gospodarstev. Razviti SI (angl. *Susceptible-Infectious*) model vključuje štiri scenarije verjetnosti prenosa; 0,02 - najboljši, 0,15 - srednji, 0,25 - ocenjeni in 0,40 - najslabši scenarij. SI model je temeljil na empirično izračunani prevalenci paratuberkuloze v Sloveniji in štirih scenarijih verjetnosti prenosa MAP z vrednostmi 0,02, 0,15, 0,25 in 0,40. S 1.000 ponovitvami modela za vsako navedeno verjetnost prenosa je bila ob koncu proučevanega obdobja napovedana prevalenca na ravni čred: 21,30 %, 38,89 %, 49,21 % in 59,85 %. V nobenem od scenarijev okužba ni dosegla nasičenosti (**slika 14**). Najvišje stopnje v dnevni incidenci smo opazili na koncu pašnega obdobja.



**Slika 14.** Krivulje okužb (črte – povprečje za 1.000 realizacij modela; površina – razpon) v časovni mrežni premikov goveda za različne verjetnosti prenosa.

Za pozitivne reje smo na podlagi podatkov o premikih od leta 2016 do 2021 pripravili tudi lokalne grafe, ki prikazujejo omrežja neposrednih stikov. Osnovni parametri omrežij se od prej opisanih niso bistveno spremenili, zato podajamo le informacije o premikih povezanih s pozitivnimi rejami. Vsa pozitivna gospodarstva so bila del močno povezane komponente (v celotnem obdobju, kot tudi v letnih omrežjih) in so beležila več premikov in večje število sosedov (25–291 stopenj) od povprečnega gospodarstva, ki je imelo 17,82 stopenj. Šest pozitivnih gospodarstev je živali premaknilo na in iz razstave ali sejma, samo eno gospodarstvo je imelo neposreden stik s planinskim pašnikom; in sicer so v rejo pripeljali dve živali iz dveh različnih planinskih pašnikov. Pozitivna gospodarstva so za nadaljnjo rejo več živali prodala kot kupila, pri čemer so kupovali samo od nekaj gospodarstev, prodajali pa precej večjemu številu različnih. Podrobno smo analizirali gospodarstva s katerimi so v zadnjih 10 letih opravili pet ali več premikov živali; povezanih gospodarstev je bilo skupno 263. 30 od teh gospodarstev je bilo v stiku z dvema ali več pozitivnimi rejami, s katerimi so imeli v premiku od 10 do nekaj tisoč živali. Na podlagi števila premikov, števila živali v premiku ter velikosti in strukture čred na povezanih gospodarstvih, smo identificirali 45 gospodarstev, ki imajo višje tveganje za prisotnost paratuberkuloze.

#### 4.4 Ukrepi v pozitivnih rejah

##### 4.4.1 Ugotavljanje razširjenosti v reji

V letu 2021 smo zaradi ugotavljanja razširjenosti povzročitelja paratuberkuloze v posamezni reji pregledali z metodo qPCR 11 farm, kjer smo skupno odvzeli 1015 vzorcev blata, od katerih je bilo pozitivnih 191 vzorcev (18,82 %) in 28 vzorcev vode iz napajalnikov, od katerih je bilo pozitivnih 8

vzorcev (28,57 %). Na 10 farmah smo vsem živalim odvzeli tudi vzorce krvi, skupno 950 vzorcev, za serološke preiskave. Od tega jih je bilo 61 pozitivnih (6,42) v komercialnem ELISA testu (Indical, IDEXX). Rezultati molekularnih (qPCR) preiskav blata in seroloških preiskav krvi (ELISA) so prikazani v **preglednici 7**.

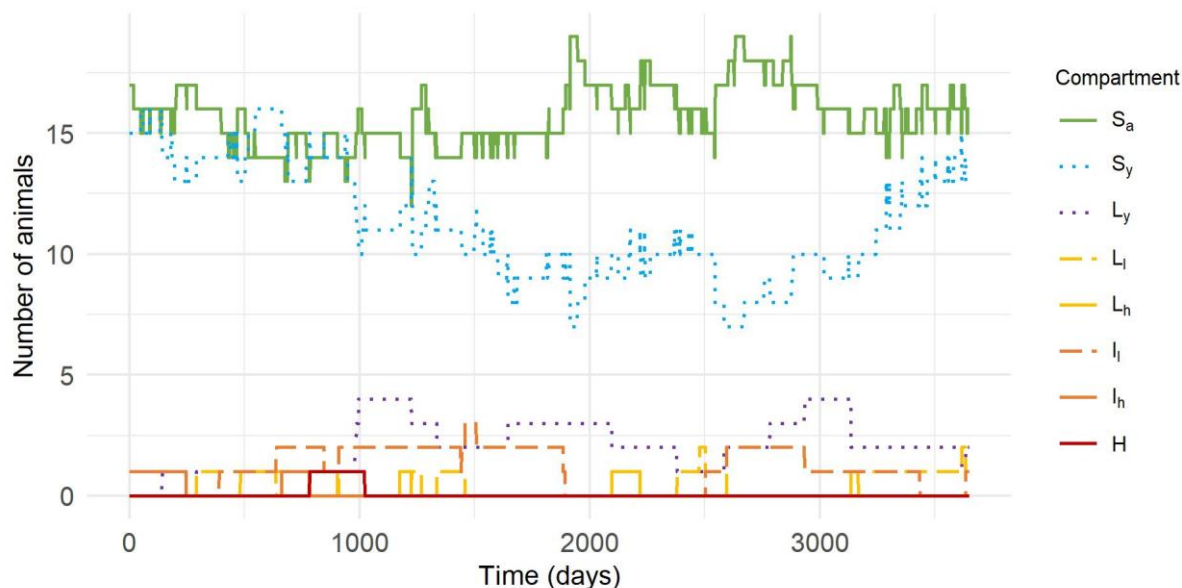
**Preglednica 7.** Rezultati qPCR in ELISA po farmah.

Farma	qPCR			ELISA		
	št. vzorcev	št. poz.	%	št. vzorcev	št. poz.	%
A	204	2	0,98	204	17	8,33
B	63	8	12,70	63	4	6,35
C	87	17	19,54	87	5	5,75
D	89	27	30,34	89	10	11,23
E	71	15	21,13	0	0	0
F	108	68	62,96	108	7	6,48
G	48	0	0,00	48	6	12,50
H	45	1	2,22	45	0	0
I	113	11	9,73	118	2	1,69
J	107	19	17,76	107	3	2,80
K	80	23	28,75	81	10	12,34
Skupno	1015	191	18,82	950	61,00	6,42

Pozitivnih je bilo 191 vzorcev blata živali iz 10 farm, prevalenca v rejah je bila v razmaku od 0 do 63 %. V kolikor izpustimo rejo, v kateri nismo ugotovili povzročitelja in rejo, ki je močno izstopala po številu pozitivnih živali, je bila povprečna prevalenca 13,7 %. Pozitivnih je bilo tudi 8 vzorcev vode. Vsaj en vzorec vode je bil pozitiven v 4 rejah, medtem ko so bili vsi vzorci mleka negativni. Na 6 farmah smo s testom ELISA našli tudi živali s protitelesi proti MAP, povprečna seroprevalenca v rejah je bila 6,75 %. Na osnovi rezultatov smo izdelali individualna priporočila za rejce.

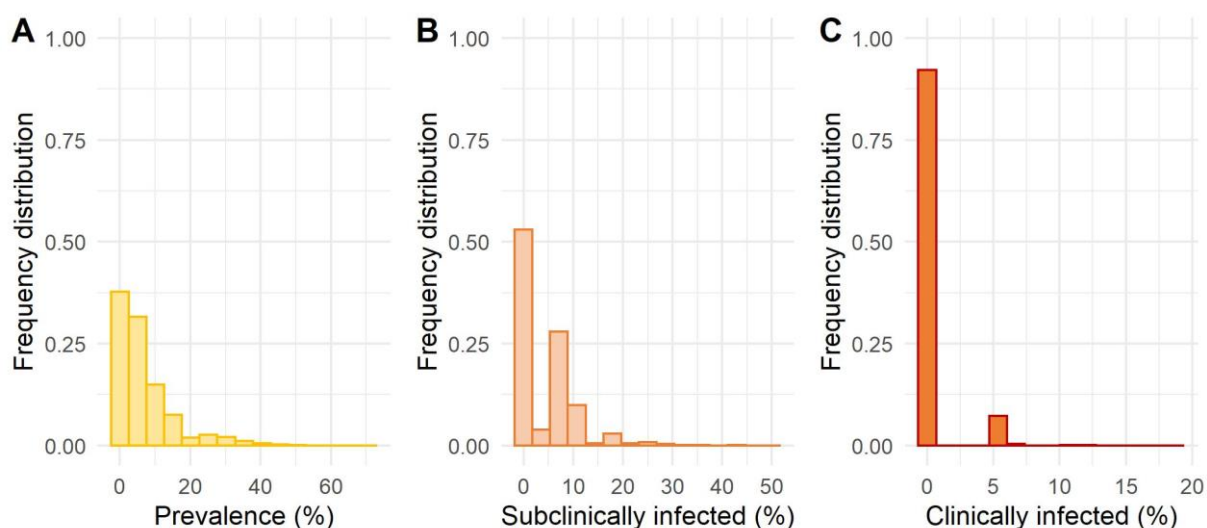
#### 4.4.2 Modeliranje prevalence na ravni črede

Razredni model širjenja MAP v čredi v nasprotju z našimi pričakovanji ni pokazal večje razširjenosti MAP znotraj črede, kot je bilo predhodno ocenjeno. Čeprav se je povprečna velikost kmetijskih gospodarstev v Sloveniji v zadnjih letih povečala (z 12,5 krav molznic v letu 2008 na 17,1 kravo molznico na kmetijo v letu 2018), to ni zagotovilo boljših pogojev za širjenje MAP. Prevalenco in delež subklinično in klinično okuženih živali v čredi smo izračunali samo na podlagi števila odraslih živali. Na **sliki 15** je prikazana simulacija dinamike okužbe znotraj ene črede skozi celotno obdobje simulacije.



**Slika 15.** Demonstracija ene ponovitve simulacije modela, ki predstavlja rezultate na ravni ene črede. Dovzetne krave ( $S_a$ ); dovzetne mlade živali ( $S_y$ ); latentne mlade živali ( $L_y$ ); latentne krave na nizki poti izločanja ( $L_i$ ); latentne krave na poti visokega izločanja ( $L_h$ ); okužene krave na poti nizkega izločanja ( $I_i$ ); okužene krave na poti visokega izločanja ( $I_h$ ); visoke izločevalke ( $H$ ).

Rezultati modela so pokazali, da je povprečna prevalenca znotraj črede 7,13 % s standardnim odklonom (SD) 8,43 %, mediano 5,56 % in najvišjo prevalenco 70,59 %. V povprečju je bilo v čredi 0,47 % klinično okuženih živali (SD 1,63 %) in 4 % subklinično okuženih živali (SD 5,42 %), pri čemer je bila mediana v obeh primerih 0 %. Porazdelitev prevalence, deleža subklinično in klinično okuženih živali je prikazana na **sliki 16**.

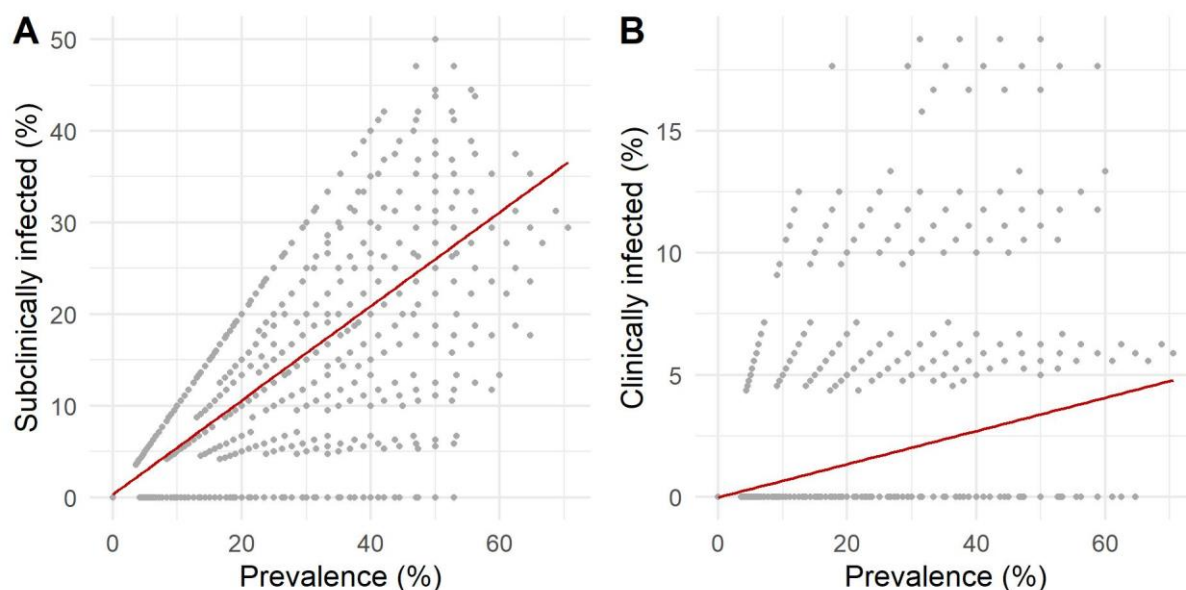


**Slika 16.** Frekvenčna porazdelitev (A) prevalenca MAP v čredi in (B) delež subklinično okuženih krav in (C) klinično okuženih krav.

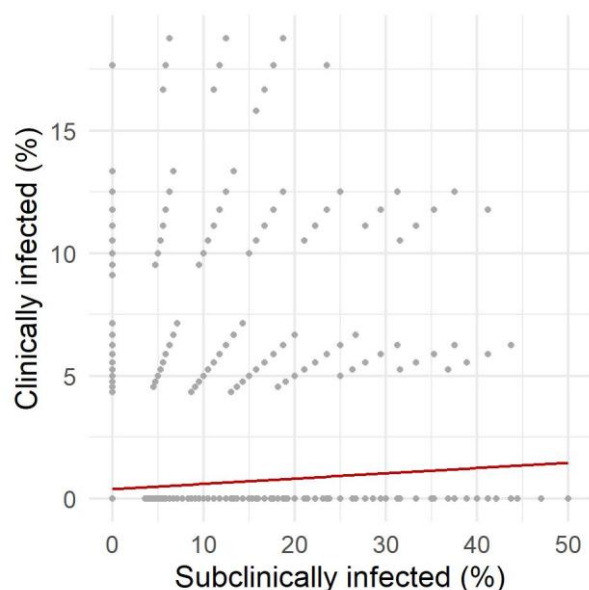
Spearmanov koeficient korelacije je pokazal močno povezanost med prevalenco in deležem subklinično okuženih živali v čredi ( $r = 0,79$ ), medtem ko je bila povezanost med prevalenco in deležem klinično okuženih živali v čredi šibka ( $r = 0,31$ ). Korelacija med deležem subklinično in klinično



okuženimi živalmi je bila zelo šibka ( $r = 0,04$ ). Vse omenjene korelacije so bile močno statistično značilne ( $p < 0,0001$ ; **sliki 17 in 18**).

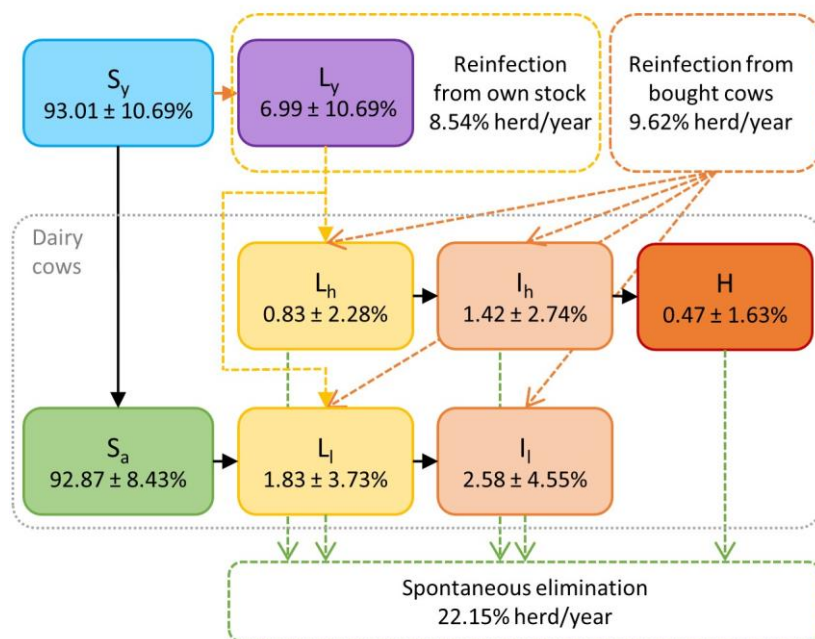


**Slika 17.** Korelacije med prevalenco MAP znotraj črede in (A) deležem subklinično okuženih krav in (B) klinično okuženih krav v čredi.



**Slika 18.** Korelacija med deležem subklinično in klinično okuženimi kravami v MAP pozitivni čredi.

Skozi celotno obdobje simulacije je od 1000 simuliranih čred ostalo okuženih le 114 čred. V povprečju so bile črede okužene 2275 dni (1093 SD). Najkrajša okužba črede je trajala 11 dni. V danih okoliščinah je bila incidenca spontanega izločanja bolezni iz črede 22 % na čredo letno, incidenca ponovne okužbe pa 18 % na čredo letno. V 10 letih je v večini čred prišlo do več spontanega izločitev in ponovnih okužb. V 676 čredah je prišlo do več kot ene spontanega eliminacije MAP, 553 čred pa je bilo ponovno okuženih več kot enkrat. Vir ponovnih okužb so bile v 47 % primerov mlade živali znotraj črede, ostale pa so bile posledica vnosa MAP v čredo s premikom živalmi. Na **sliki 19** je prikazan povzetek rezultatov simulacije.



**Slika 19.** Porazdelitev živali po posameznih zdravstvenih stanjih v modelu širjenja MAP v tipični slovenski molznici. (A) Število živali v posameznem zdravstvenem stanju. (B) Diagram poteka modela, ki prikazuje delež krav v vsakem zdravstvenem stanju od skupnega števila krav molznic v čredi ter delež mladih telet in telic v dveh stanjih mladih živali (srednja vrednost ± standardni odklon). Možne ponovne okužbe in spontane izločitve (povprečje na čredo/leto) so označene s črtkanimi črtami. Dovzetne krave ( $S_a$ ); dovzetne mlade živali ( $S_y$ ); latentne mlade živali ( $L_y$ ); latentne krave na nizki poti izločanja ( $L_l$ ); latentne krave na poti visokega izločanja ( $L_h$ ); okužene krave na poti nizkega izločanja ( $I_l$ ); okužene krave na poti visokega izločanja ( $I_h$ ); visoke izločevalke ( $H$ ).

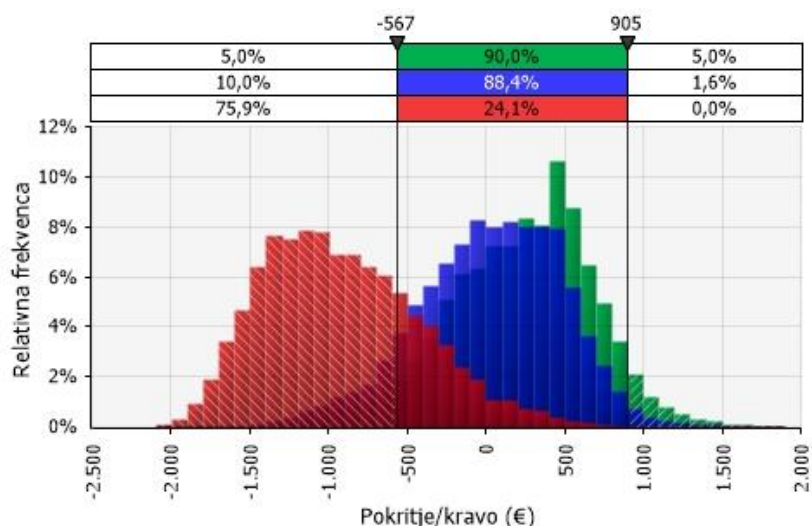
#### 4.5 Izdelava ocene ekonomskega vpliva bolezni

##### 4.5.1 Bio-ekonomski model vpliva paratuberkuloze

Rezultati ekonomskega vpliva paratuberkuloze so podani na letni ravni na kravo, pri čemer se denarne vrednosti nanašajo na podatke o cenah iz leta 2020. Rezultati odražajo v našem modelu postavljene predpostavke o incidenci normalno prisotnih bolezni pri MAP negativnih živalih, vplivih paratuberkuloze pri MAP pozitivnih živalih ter verjetnosti zdravljenja živali.

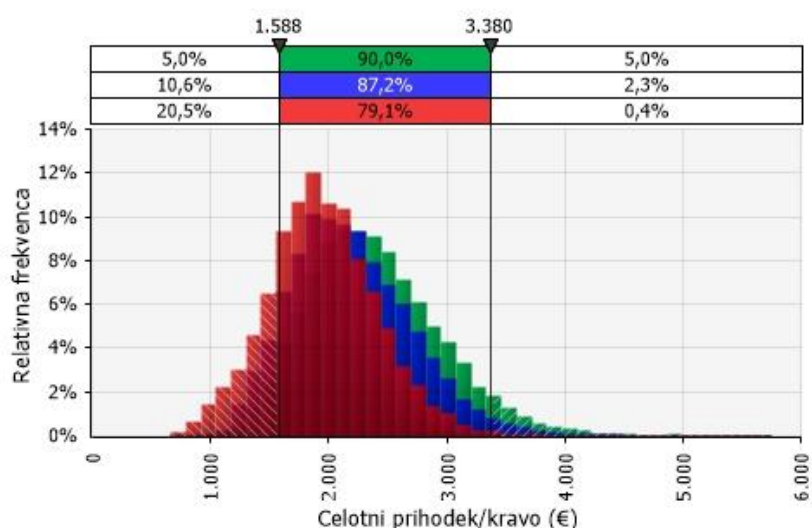
Povprečno pokritje na MAP negativno kravo molznico, je bilo 227 € s SD 454 € (**slika 20**). Zaradi vključene normalne incidence drugih bolezni (abortusa, zaostale placente, kliničnega mastitisa) in njihovega vpliva na proizvodne in reprodukcijske parametre je pri MAP negativnih živalih lahko pokritje doseglo tudi minimum -1.470 €. V najboljšem primeru pa je bilo lahko pokritje do 1.899 €. Pri subklinično okuženih živalih je bilo pokritje v povprečju 194 € nižje, SD pa je bil podoben (459 €). Pokritje je bilo pri teh živalih, ki ne kažejo kliničnih znakov, med -1.558 € in 1.705 €. Klinično okužene živali, so imele v primerjavi s prvima dvema podmodeloma značilno nižje pokritje. V povprečju je bilo pokritje -916 € s SD 495 €, razpon pa je bil od -2.094 € in 927 € na klinično okuženo kravo. Analiza občutljivosti je pokazala, da je od vplivov paratuberkuloze pri subkliničnih živalih na pokritje najbolj vplivala povečana incidenca kliničnega mastitisa in zaostale placente, medtem ko je pri klinično okuženih živalih na pokritje najbolj vplivalo predčasno izločanje živali iz črede in s tem povezani stroški obnove črede.





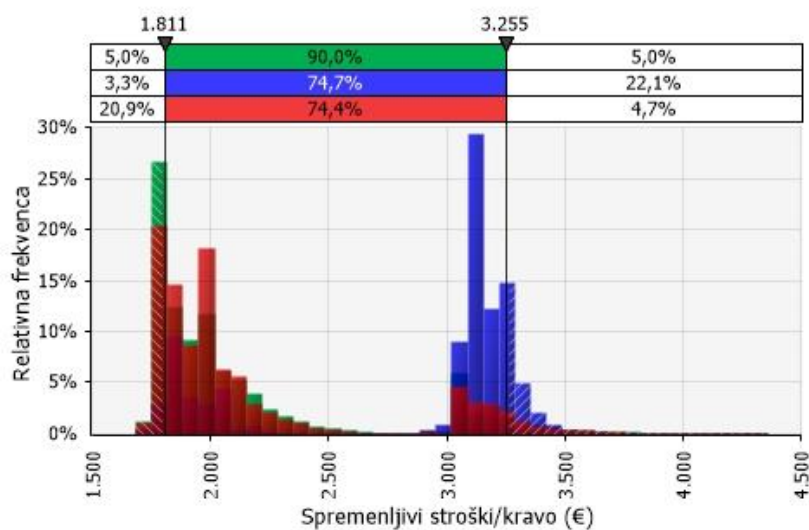
**Slika 20.** Verjetnostna porazdelitev pokritja na ravni krave molznice. Prikazani so rezultati za vse tri podmodele glede na zdravstveno stanje živali; MAP negativne živali (zelena), subklinično okužene (modra) in klinično okužene (rdeča) živali.

Iz analize občutljivosti pri pokritju na ravni živali je bilo razvidno, da so k razlikam med tremi pod modeli najbolj doprinesli spremenljivi stroški in ne celotni prihodki na žival, kar je razvidno tudi iz **slike 21**, kjer so prikazane verjetnostne porazdelitve rezultatov za celotni prihodek. Pri MAP negativnih živalih so bili celotni prihodki v povprečju 2.390 € ± 552 €, pri subklinično okuženih 2.196 € ± 516 € in pri klinično okuženih 1.953 € ± 463 € na žival. Pri subklinično okuženih živalih so od vplivov paratuberkuloze na celotne prihodke najbolj vplivali podaljšanje obdobja med osemenitvami, incidenca kliničnega mastitisa in znižana mlečnost, ki so k varianci doprinesli skupno 2,58 %. Pri klinično okuženih pa sta imeli največji vpliv znižana mlečnost, ki je k celotni varianci doprinesla 20,47 % ter stopnja izločanja živali, ki je doprinesla 23,13 %.



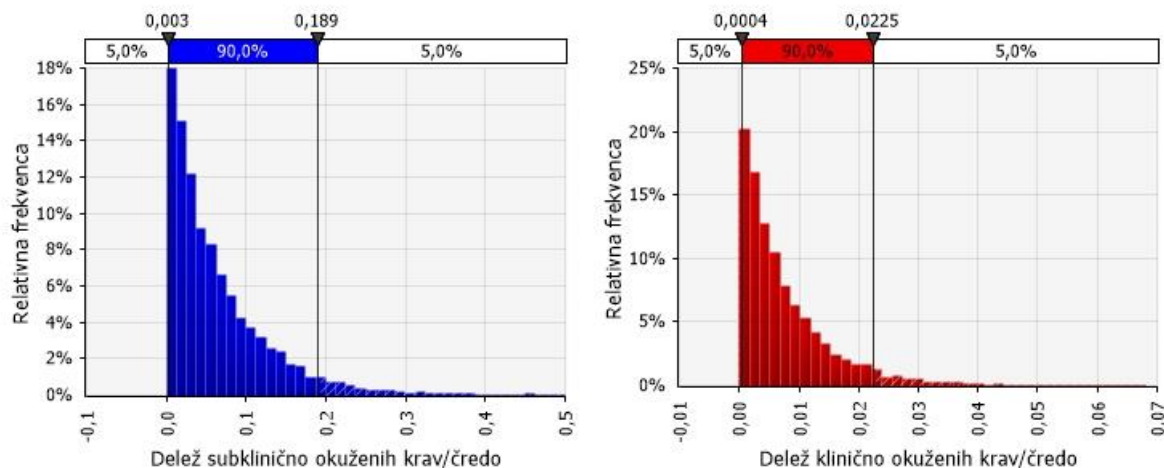
**Slika 21.** Verjetnostna porazdelitev celotnih prihodkov na ravni krave molznice. Prikazani so rezultati za vse tri podmodele glede na zdravstveno stanje živali; MAP negativne živali (zelena), subklinično okužene (modra) in klinično okužene (rdeča) živali.

Pri vseh treh podmodelih je porazdelitev spremenljivih stroškov izrazito bimodalno (**slika 22**), kar je posledica izločanja živali in s tem visokimi stroški za obnovo črede (desni vrh). Pri MAP negativnih in subklinično okuženih živalih je desni vrh primerljiv, medtem ko je pri klinično okuženih značilno višji, zaradi višje verjetnosti izločanja živali. Spodnji in zgornji kvartil spremenljivih stroškov na žival so bili: 1.811 € in 2.194 € pri MAP negativni živali, 1.841 € in 2.160 € pri subklinično okuženi živali ter 2.411 € in 3.221 € pri klinično okuženi živali. Vpliv paratuberkuloze, ki je imel največji vpliv na spremenljive stroške pri subkliničnih živalih sta bili povečana incidenca kliničnega mastitisa in zaostale placent, ki sta skupno k variabilnosti rezultatov doprinesli 2,57 %. Največji vpliv je imelo izločanje živali, vendar pri subklinično okuženih živalih incidenca izločanja ni bila višja kot pri MAP negativnih, zato tega ne podajamo kot vpliv paratuberkuloze. Pri klinično okuženih pa je na skupne stroške najbolj vplivalo izločanje živali, ki je k varianci doprineslo 84,68 %, medtem ko sta povečana incidenca kliničnega mastitisa in zaostale placent skupno pojasnili 2,16 % variabilnosti.



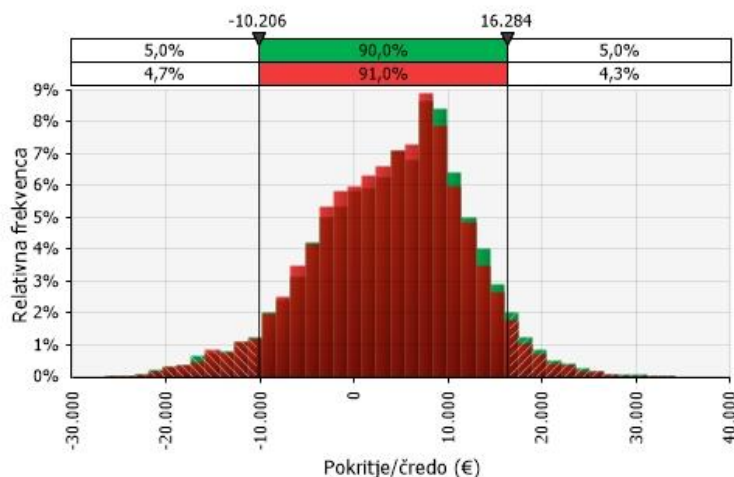
**Slika 22.** Verjetnostna porazdelitev spremenljivih stroškov na ravni krave molznice. Prikazani so rezultati za vse tri podmodele glede na zdravstveno stanje živali; MAP negativne živali (zelena), subklinično okužene (modra) in klinično okužene (rdeča) živali.

Na ravni črede smo primerjali celotne prihodke, spremenljive stroške in pokritje med MAP negativno in pozitivno mlečno čredo, ki je štela 18 krav. Število subklinično in klinično okuženih živali smo modelirali na podlagi razrednega modela, pri čemer je bila v pozitivni čredi vsaj ena okužena žival. Na **sliki 23** je prikazana porazdelitev deleža subklinično in klinično okuženih živali v MAP pozitivni čredi.



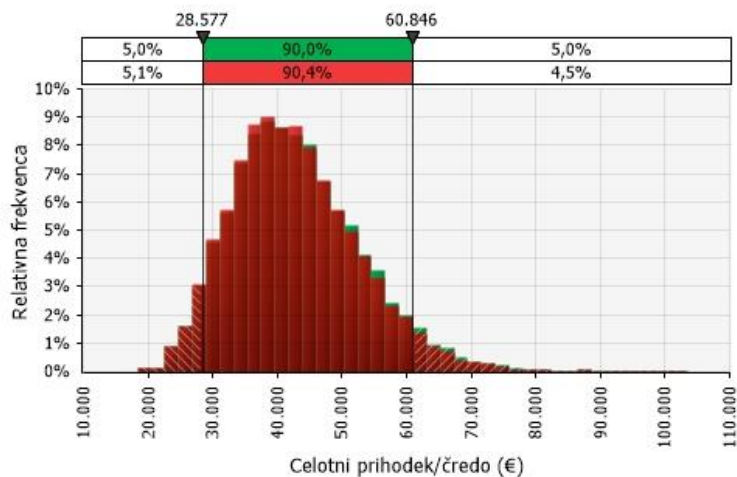
**Slika 23.** Verjetnostna porazdelitev deleža subklinično in klinično okuženih živali v MAP pozitivni čredi.

Pri MAP pozitivni čredi je bilo pokritje v povprečju 7,61 % nižje kot v MAP negativni čredi (**slika 24**). Povprečno pokritje pri negativni čredi je bilo 4.095 € ± 8.177 € SD, pri pozitivni čredi pa 3.783 € ± 7.951 € SD. Analiza občutljivosti je pokazala, da na pokritje bolj vplivajo subklinično kot klinično okužene živali, saj je slednjih manj. Subklinično okužene so k varianci doprinesle 0,75 %, medtem ko so klinično okužene doprinesle le 0,04 %.

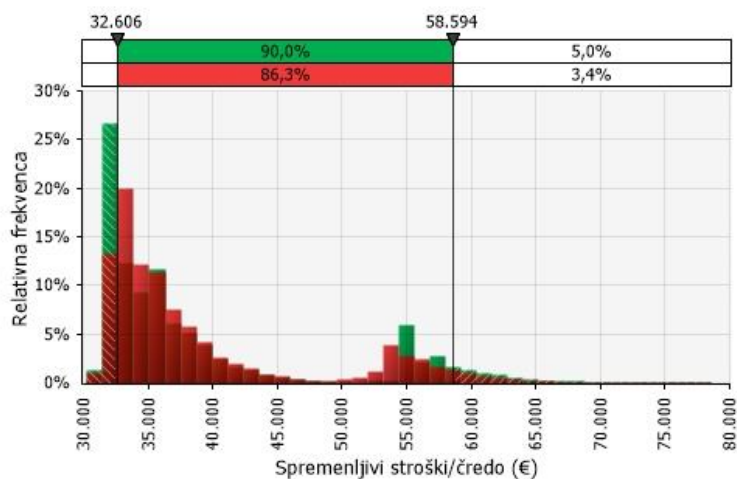


**Slika 24.** Verjetnostna porazdelitev pokritja na ravni črede krav molznic. Prikazani so rezultati za čredo proste paratuberkuloze (zelena) in čredo, ki je MAP pozitivna (rdeča).

Celotni prihodki na ravni črede so bili pri MAP pozitivni čredi le za 0,68 % nižji kot pri MAP negativni čredi (**slika 25**). Povprečni prihodek na negativno čredo je bil 43.018 € ± 18.421 € SD, pri pozitivni čredi pa 42.724 € ± 18.322 € SD. Enako kot na ravni živali so imeli spremenljivi stroški tudi na ravni črede bimodalno porazdelitev (**slika 26**). Spodnji in zgornji kvantili spremenljivih stroškov so bili: 39.499 € in 33.066 € pri MAP negativni čredi ter 32.606 € in 39.846 € pri MAP pozitivni čredi.



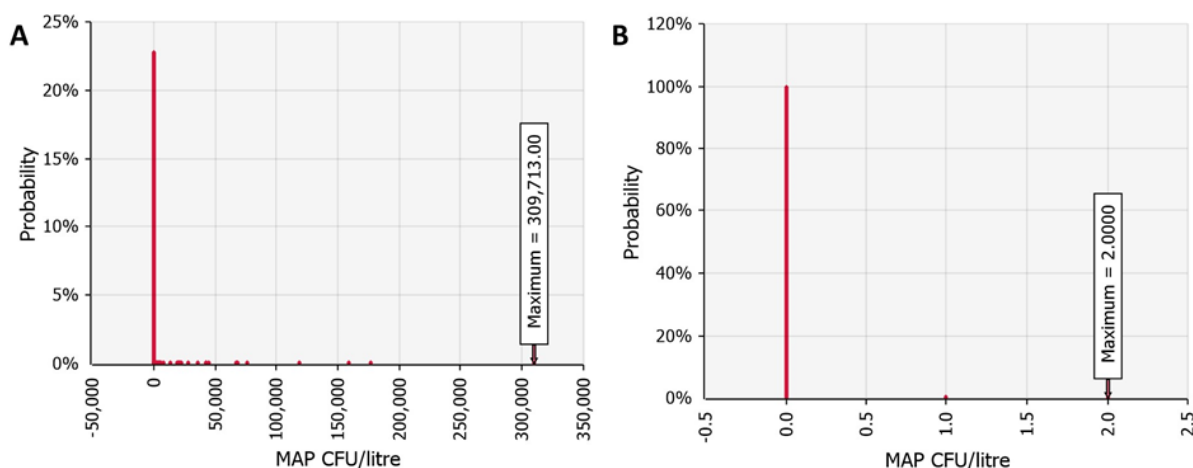
**Slika 25.** Verjetnostna porazdelitev celotnih prihodkov na ravni črede krav molznic. Prikazani so rezultati za čredo proste paratuberkuloze (zelena) in čredo, ki je MAP pozitivna (rdeča).



**Slika 26.** Verjetnostna porazdelitev spremenljivih stroškov na ravni črede krav molznic. Prikazani so rezultati za čredo proste paratuberkuloze (zelena) in čredo, ki je MAP pozitivna (rdeča).

#### 4.5.2 Izpostavljenost slovenskega potrošnika bakteriji MAP v mleku

V primeru MAP pozitivne kmetije je bila verjetnost, da je bilo surovo mleko v rezervoarju in s tem tudi surovo konzumno mleko na ravni kmetije kontaminirano z MAP, visoka. Rezultati so pokazali, da je verjetnost, da je liter mleka vseboval celice MAP, višja od 85 %, medtem ko je bila verjetnost, da vsebuje več kot 100 CFU MAP na liter mleka nekoliko manj kot 2 %. Posledično je bila verjetnost izpostavljenosti MAP s surovim mlekom iz MAP pozitivne reje v enem letu 100 %. S pasterizacijo mleka, se je verjetnost izpostavljenosti MAP preko mleka v enem letu zniža na manj kot 3 % (**slika 27**). Na ravni mlečne industrije je bil rezultat simulacije v vseh treh scenarijih prevalence MAP (glej **slika 14**; verjetnosti prenosa MAP med čredami 2, 15 in 25 %), da verjetnost za izpostavljenost MAP preko pasteriziranega polnomastnega mleka in preko mleka, obdelanega pri ultra visoki temperaturi ne obstaja.



**Slika 27.** Diskretna verjetnost kontaminacije MAP na liter (A) surovega mleka in (B) pasteriziranega mleka na kmetiji, ki je MAP pozitivna.

Glede na delež posameznih vrst mleka na trgu in ob predpostavkah, da povprečni potrošnik uživa vse omenjene vrste mleka in da je porazdelitev pozitivnih čred naključna, je možnost izpostavljenosti nizki količini živih celic MAP na letni ravni v Sloveniji od 21 do 49 %. Za povprečnega slovenskega potrošnika je bila verjetnost izpostavljenosti MAP v enem letu možna, kar pomeni, da se je lahko zgodilo ali bi se moralo zgoditi v nekem trenutku. Količina MAP, ki bi ji lahko bil izpostavljen povprečni potrošnik, je bila nizka, zato smo ocenili, da je bilo splošno tveganje za izpostavljenost MAP nizko. Z upoštevanjem danih predpostavk in negotovosti smo ocenili, da je splošno tveganje za izpostavljenost MAP preko mleka majhno. Za ljudi, ki uživajo surovo mleko s kmetij s paratuberkulozo, je tveganje visoko. Tveganje za izpostavljenost preko pasteriziranega mleka v maloprodaji in preko drugega predelanega mleka smo ocenili kot zanemarljivo (**preglednica 8**).

**Preglednica 8.** Povzetek opredelitve tveganja po vrsti mleka na ravni kmetije in mlečne industrije ter splošna izpostavljenost povprečnega slovenskega potrošnika.

	<i>Verjetnost izpostavljenosti</i>	<i>Raven MAP CFU/liter mleka</i>	<i>Stopnja tveganja</i>	<i>Stopnja negotovosti</i>
Surovo mleko iz cisterne na MAP pozitivni kmetiji	Skoraj gotova	Visoka	Visoka	Nizka do srednja
Pasterizirano na MAP pozitivni kmetiji	Malo verjetna	Nizka	Nizka	Nizka do srednja
Pasterizirano mleko na ravni mlečne industrije (vsi trije scenariji)	Redka	Nepomembna	Zanemarljiva	Nizka do srednja
UHT mleko na ravni mlečne industrije	Nepomembna	Nepomembna	Zanemarljiva	Nizka
Izpostavljenost povprečnega slovenskega potrošnika	Možna	Nizka	Nizka	Srednja

Glavne pomanjkljivosti predstavljene ocene tveganja so izključitev uvoza in izvoza surovega mleka, mleka in mlečnih izdelkov v maloprodaji, naključna izbira kmetij, ki oddajo mleko v mlekarne, in predpostavka o obstoju povprečnega potrošnika. Najpomembnejše negotovosti, povezane s spremenljivkami v modelu, so epidemiološke značilnosti MAP. Najpomembnejša negotovost, povezana z metodologijo, je kalibracija in validacija modela z neodvisnimi podatki, saj empirični podatki niso na voljo.

#### **4.6 Predlog za certificiranje rej/ predloga pravilnika o pogojih za priznanje, pridobitev in vzdrževanje statusa črede, proste paratuberkuloze (Johnejeve bolezni) pri govedu**

Osnutek/Predlog pravilnika je priloga tega poročila.

## **5 RAZPRAVA**

### **5.1 Ocena prevalece paratuberkuloze v Sloveniji**

Za oceno prevalece na ravni črede in na ravni živali, smo se poslužili tako empirične kot tudi modelne raziskave. Naša hipoteza je bila, da se je s povečanjem velikosti kmetijskih gospodarstev v Sloveniji in s trendom rasti prevalece paratuberkuloze po svetu, tudi pri nas prevalenca paratuberkuloze značilno povišala v primerjavi z zadnjimi ocenami, ki so bile narejene pred več kot desetletjem. V študiji o prevaleci MAP na ravni čred in živali leta 2002 so Ocepek in sod. menili, da je mogoče nizko prevalenco MAP v Sloveniji delno razložiti z obstojem številnih majhnih čred, saj je širjenje znotraj čred bolj verjetno kot med čredami. V zadnjih nekaj letih se je v Sloveniji povečala povprečna velikost kmetijskih gospodarstev, kar predstavlja boljše pogoje za širjenje MAP.

#### **5.1.1 Empirična raziskava**

Empirično smo prevalenco paratuberkuloze ugotavljali v rejah bikovskih mater črno bele pasme. V čredah smo načrtovali dvojno vzorčenje, prvič v letu 2019 in drugič v letu 2020 oz. pri nekaterih rejah v 2021, saj se tem poviša občutljivost monitoringa. Poleg vzorčenja različnih matrikov, smo načrtovali tudi ogled gospodarstev in anketiranje rejcev. Zaradi ukrepov povezanih s COVID-19 se je vzorčenje v rejah in anketiranje rejcev nekoliko razlikovalo od prvotnih planov.

V obeh letih smo vzorčenje opravili v 84 rejah, skupno pa smo v letu 2019 vzorčenje opravili v 89 rejah, v letu 2020/2021 pa v 118 rejah. Odvzeli smo vzorce blata in krvi vsem živalim starejših od dveh let, vzorce vode in skupinski vzorec mleka. Vsa gospodarstva so bila pregledana, odgovore na vprašalnike pa smo prejeli od 75 rejcev.

Rezultati vzorcev fecesa so pokazali, da je bilo v obeh letih pozitivnih 7,14 % rej, na posamezno leto pa nekoliko več kot 4 % rej. V 11 pozitivnih rejah je bil opravljen podroben pregled in posvet z rejcem. Tem rejcem smo na podlagi značilnosti reje podali individualna priporočila za omejevanje nadaljnjih okužb v reji. Gre za oceno navidezne prevalece; zaradi pomanjkanja informacij o občutljivosti in specifičnosti monitoringa paratuberkuloze in nenaključnega vzorčenja čred, resnične prevalece na ravni čred ni moč izračunati. V vzorcih vode smo MAP ugotovili v osmih od skupno 28 vzorcev vode. V sedem odvzetih vzorcih mleka nismo ugotovili prisotnosti MAP. Od skupno testiranih 1.015 živali je bilo pozitivnih 191 vzorcev blata živali iz desetih farm. Povprečna prevalenca

paratuberkuloze v rejah je bila 13,6 %. Testiranje s testom ELISA pa je pokazalo, da je bila povprečna seroprevalenca v rejah 7,1 %.

V študiji, ki je obravnavala nadzor nad paratuberkulozo v 48 različnih državah, je bila najpogosteje poročana razširjenost znotraj črede v čredah krav molznic 5–15 %. Vendar, številne študije opozarjajo na problem neustreznih diagnostičnih testov in pojav ledene gore pri subkliničnih okužbah s paratuberkulozo (Whittington et al., 2019). Nekateri raziskovalci ocenjujejo, da je do 70 % okuženih živali nezaznavnih (Whitlock in Buergelt, 1996).

V tem projektu smo za oceno števila MAP v vzorcih fecesa validirali molekularno metodo qPCR, ki temelji na pomnoževanju gena F57. Metodo smo umerili z digitalnim PCR. Na dobre lastnosti validirane qPCR metode kaže dosežena meja detekcije, ki je bila 300 MAP na gram fecesa in meja kvantifikacije 892 MAP na gram fecesa. Poleg ugotavljanja števila bakterij MAP s qPCR smo 188 živalim vključenim v študijo primerov in kontrol izmerili sposobnost vezave železa, vsebnost vitamina D3 in skupno antioksidantno kapaciteto v krvnem serumu. Pri živalih, ki izločajo več bakterij, se rezultati preiskovanih biokemijskih parametrov slabšajo, kar pripisujemo vplivom bolezni.

### **5.1.2 Modelna raziskava**

Za oceno deleža subklinično in klinično okuženih krav v tipični slovenski čredi krav molznic, okuženi z MAP, smo razvili stohastični razredni model. V nasprotju z našimi pričakovanji naš model ni pokazal višje razširjenosti MAP znotraj črede v Sloveniji, kot je bilo predhodno ocenjeno (Kušar et al., 2011). Čeprav se je povprečna velikost črede povečala z 12,5 krave molznice v letu 2008 na 17,1 krave molznice na kmetijo v letu 2018, to še vedno ni zagotovilo boljših pogojev za širjenje MAP. Rezultati modela so se ujemali z empiričnimi podatki, ki smo jih zbrali v tem projektu.

Analiza občutljivosti je pokazala, da sta stopnja prenosa iz subklinično okuženih krav na mlade živali in na dovezne krave najpomembnejša parametra pri določanju prevalence v čredi. Tej je tesno sledila stopnja prenosa iz klinično okuženih kravah, vendar je bil skupni učinek manjši, ker je bilo klinično okuženih manj. Ti rezultati kažejo, da bi imelo pri uporabljenih predpostavkah izločanje le klinično okuženih živali omejen učinek na znižanje razširjenosti MAP v čredi.

Predstavljen stohastični razredni model je prvi, ki je bil posebej zasnovan za prikaz dinamike okužbe paratuberkuloze v majhni čredi krav molznic. Čeprav je objavljenih nekaj poskusov modeliranja majhnih čred, te v kontekstu strukture slovenskih gospodarstev niso bile majhne. Poleg tega naš model ni bil stabilen, ko smo nastavili začetno velikost črede na 100 krav molznic. Naši rezultati kažejo, da je za preučevanje širjenja MAP v čredah različnih velikosti uporabiti različne modele. Razvoj tega modela je pomemben tudi za druge države s podobnim sistemom, saj lahko služi tudi za testiranje učinkovitosti različnih nadzornih ukrepov. To bi lahko bilo zelo pomembno, če se v prihodnosti vzpostavi povezava med MAP in človeškimi boleznimi.

Da bi ugotovili, ali bi analiza premikov goveda lahko nudila podporo pri povečanju učinkovitosti kontrolnih ukrepov za paratuberkulozo v Sloveniji, smo uporabili analizo omrežja na letnih in mesečnih presekih omrežja premikov goveda. Čeprav je omrežje premikov pri nas manjše in nekoliko manj aktivno v primerjavi z drugimi evropskimi državami, si z njimi deli številne lastnosti; kot so podobna porazdelitev stopinj, povprečna dolžina najkrajše poti in premer omrežja (Natale et al., 2009; Nöremark et al., 2011; Mweu et al., 2013; Dutta et al., 2014; Vidondo in Voelkl, 2018).

V mesečnih mrežah sta bila opazna dva vrha v pogostosti premikov živali pozno spomladi do zgodnjega poletja in jeseni, kar je posledica obdobja paše. Podobni sezonski vzorci so bili opisani tudi v drugih državah s pašništvom (Natale et al., 2009; Nöremark et al., 2011; Vidondo in Voelkl, 2018).

Tako kot v študijah v drugih državah (Natale et al., 2009; Frössling et al., 2013; Marquetoux et al., 2016b) so se tudi mere središčnosti in pomembnosti na ravni vozlišč izkazale v veliko pomoč pri prepoznavanju gospodarstev, ki so z epidemiološkega vidika pomembnejša v primerjavi z drugimi gospodarstvi. Glede na tip gospodarstev so bili to zbirni centri, pašniki in planine.

Čeprav so mere središčnosti in pomembnosti skozi čas primerljive, se je izkazalo, da so se posamezne povezave med gospodarstvi ohranile le do določene mere. Simulacija ciljne odbire gospodarstev je pokazala, da se disociacija omrežja bistveno izboljša, ko vozlišča izločamo glede na vrednosti lokalnih mer in ko uporabimo nedavne podatke. Kenschake in sod. (2013) so pokazali, da so vozlišča, ki so najpomembnejša v statičnem omrežju pomembna tudi v časovnem, kjer se upošteva sosledje premikov. Rezultati kažejo na uporabnost podatkov o premikih govedi za izvajanje ciljnih nadzornih ukrepov, saj lahko določimo, katera gospodarstva predstavljajo večje tveganje za vnos ali širjenje bolezni.

Za oceno morebitnega širjenja bolezni s premiki goveda smo uporabili polno časovno omrežje z ločljivostjo enega dne. V predstavljenem modelu možnega širjenja MAP smo uporabili empirično ocenjeno prevalenco paratuberkuloze v Sloveniji in štiri scenarije za verjetnosti prenosa. Na hitrost širjenja bolezni po omrežju sta pomembno vplivali razširjenost MAP znotraj črede in verjetnost okužbe živali v premiku. Najvišje stopnje dnevne incidence na novo okuženih čred so bile opažene ob koncu pašnega obdobja. Čeprav je model temeljil na več enostavnih predpostavkah, je ponudil vpogled v pomen premikov med gospodarstvi za širjenje bolezni v populaciji goveda.

Predstavili smo prvo poglobljeno analizo kompleksnega omrežja premikov goveda v Sloveniji. Uporabljeni pristop modeliranja širjenja MAP med čredami z razredčenimi omrežji se prav tako lahko uporabi za modeliranje drugih poti prenosa bolezni med čredami in tudi drugih bolezni. Naši rezultati kažejo, da bi analiza omrežja premikov govedi lahko pripomogla k optimizaciji spremljanja in obvladovanja paratuberkuloze v Sloveniji.

## **5.2 Ocena ekonomskih posledic paratuberkuloze**

### **5.2.1 Bio-ekonomski model vpliva paratuberkuloze**

Čeprav različne študije vključujejo MAP modele, ocen ni mogoče preprosto prenesti na drugo regijo ali v drugo časovno obdobje. Potrebno je upoštevati razlike v okoljskih dejavnikih, populaciji dovezetnih živali, proizvodnih sistemih in pravnem sistemu držav (Dijkhuizen in Morris, 1997). Znano je, da paratuberkuloza povzroča znatne neposredne izgube v govedoreji (Barkema in sod., 2010; Cho in sod., 2013) in posledično pritiska na enega najpomembnejših delov slovenskega kmetijstva.

V našem modelu smo upoštevali značilnosti tipične slovenske črede krav molznic in cene v letu 2020 ter podatke o incidenci drugih zdravstvenih težav, ki so navadno prisotne v čredah krav molznic. Vse spremenljivke o vplivu paratuberkuloze so bile vključene na podlagi literature in ekspertnih ocen. Model je bil sestavljen iz podmodelov za MAP negativno, subklinično in klinično okuženo žival. Prevalenco paratuberkuloze smo simulirali glede na naše ocene o deležu subkliničnih in kliničnih živali. Da smo dobili izračune na ravni črede, smo pridobljen podatek o številu živali na vsako zdravstveno stanje uporabili za vzorčenje iz rezultatov na ravni živali.

Rezultati bio-ekonomskega modela so pokazali, da so v primerjavi s celotnimi prihodki na MAP negativno kravo prihodki na subklinično okuženo žival v povprečju nižji za 8,10 %, na klinično okuženo pa za 18,23 %. Stroški za subklinično žival so v povprečju višji le za 0,02 %, medtem ko so pri kliničnih okuženih višji za 32,76 %. Zaradi nizke prevalence znotraj črede in predvsem zaradi nizkega števila



klinično okuženih živali je v povprečju pokritje na MAP pozitivno čredo v primerjavi z negativno čredo nižje za 7,61 %. Izračuni so veljavni le za majhne črede, saj vsi vključeni stroški odražajo podatke o kalkulacijah za tipične slovenske črede. Potrebno pa je upoštevati tudi vse predpostavke o upravljanju črede.

Stroški, ki jih pri modeliranju ekonomskega vpliva paratuberkuloze nismo upoštevali, so vpliv na dobrobit živali ter vpliv na trge in trgovanje. Ti vplivi so etično, družbeno in politično pomembni in jih je mogoče ovrednotiti z denarnimi enotami, vendar kvantitativna ocena teh vplivov presega obseg tega projekta. Ker še ni potrjeno, da bi bila MAP zoonoza in ker morebitna infektivna doza, čas izpostavljenosti in možne posledice še niso znani, ocena vpliva paratuberkuloze na javno zdravje ni mogoča. Smo pa na podlagi bio-ekonomskega modela pripravili oceno tveganja izpostavljenosti bakteriji MAP preko mleka in mlečnih izdelkov za slovenskega potrošnika.

V primeru, da bo povezava med MAP in boleznimi pri človeku potrjena, bi lahko prišlo ne le prepovedi oddaja mleka iz MAP pozitivnih čred in prepovedi trgovanja z živalmi in izdelki. V letu 2018 je Slovenija izvozila za več kot 169 milijonov evrov mleka in mlečnih izdelkov, uvozila pa za več kot 173 milijonov evrov. Poleg tega bi lahko prišlo tudi do javnega strahu in drastičnega padca povpraševanja najverjetneje predvsem po mleku in mlečnih izdelkih. Pri tem ne bi prišlo samo do izrazitih sprememb na trgu in nižjega dohodka rejcev, pač pa bi bilo ogroženo tudi njihovo preživetje.

### **5.2.2 Izpostavljenost slovenskega potrošnika bakteriji MAP v mleku**

Glavni razlog za razvoj modela za oceno tveganja je vse večja skrb za javno zdravje in nenehna prizadevanja za oceno in posledično zmanjšanje izpostavljenosti ljudi patogenom prek hrane živalskega izvora. Drugi razlog je pomembnost mlečnega sektorja v slovenskem kmetijstvu (Bedrač in sod., 2018).

Naši rezultati se ujemajo z zaključki drugih študij (Cerf et al. 2007; Weber et al., 2008; Boulais et al., 2011; Okura et al., 2013), da zahtevani čas pasterizacije in temperaturni režimi pri ocenjeni stopnji kontaminacije mleka v mlekarni zadoščajo za inaktivacijo MAP. Cerf in sod. (2007) so predvidevali, da študije, ki so poročale o prisotnosti MAP v maloprodajnem mleku, niso pokazale verjetne kontaminacije surovega mleka. Kot možne razloge za prisotnost MAP v maloprodajnem mleku so navedli nepravilno pasterizacijo, navzkrižno kontaminacijo vzorcev v laboratorijih in kontaminacijo pasteriziranega mleka s surovim mlekom med predelavo v mlekarni.

Naši rezultati deleža kontaminiranih litrov surovega mleka na ravni kmetije so pokazali velik delež mleka, ki je vseboval žive celice MAP. Po pasterizaciji mleka na gospodarstvu je bil MAP večinoma inaktivirana, vendar ne v celoti. Domneva se, da bi lahko bilo celo majhno število celic MAP odgovorno za sprožitev čezmernega imunskega odziva in tako pri nekaterih bolnikih povzročilo Crohново bolezen. Rezultati kvantitativne ocene izpostavljenosti z upoštevanjem osnovnih predpostavk in negotovosti kažejo, da je tveganje za izpostavljenost ljudi bakteriji MAP preko mleka in mlečnih izdelkov v Sloveniji nizko, ne pa zanemarljivo. To še posebej velja za ljudi z obstoječimi obolenji in dojenčke, saj je uživanje surovega mleka in domačih mlečnih izdelkov v Sloveniji precej pogosto. Ranljive skupine naj se izogibajo pitju surovega mleka ali pa surovo mleko pred zaužitjem prekuhajo.

Pomembno je poudariti, da je tveganje za izpostavljenost MAP preko mleka, ki ga zbirajo mlekarnice, in preko predelanega mleka, najverjetneje zanemarljivo. Čeprav smo kvantitativno oceno izpostavljenosti izvedli le za surovo mleko, pasterizirano polnomastno mleko in mleko, obdelano pri ultra visoki temperaturi, menimo, da se rezultati lahko do neke mere prenesejo tudi na druge mlečne izdelke na zadevni ravni proizvodnje.

Naši rezultati lahko nudijo podporo za informirano odločanje o kontrolnih ukrepih za nadzor MAP v Sloveniji in tudi v drugih državah s podobno strukturo mlečnih gospodarstev. V primeru, da bo povezava med MAP in boleznimi pri človeku potrjena, lahko naša raziskava služi kot dober začetek prizadevanj za zmanjšanje tveganja. V raziskavi smo pokazali, da je kljub pomanjkanju empiričnih podatkov z modeliranjem mogoče pridobiti celovit vpogled v tveganje za izpostavljenosti ljudi bakteriji MAP. Nazadnje je treba poudariti, da bi naše rezultate lahko uporabili v drugih državah ali regijah s podobno strukturo mlečnih čred.

## 6 ZAKLJUČKI

Empirični podatki o prevalenci paratuberkuloze v čredi pridobljeni v tej raziskavi in razredni model sta pokazala podobno razširjenost MAP znotraj črede, kot so ocenile predhodne raziskave v Sloveniji. Rezultati kažejo, da je dinamika širjenja MAP in s tem prevalenca v manjših čredah drugačna, kot v večjih. Posledično je potrebno v čredah različnih velikosti za modeliranje širjenja in kontrolnih ukrepov uporabiti različne modele. V raziskavi smo predstavili prvo poglobljeno analizo kompleksnega omrežja premikov goveda v Sloveniji. Naši rezultati kažejo, da lahko analiza omrežja premikov govedi pripomore k optimizaciji spremljanja in obvladovanja paratuberkuloze v Sloveniji. Na podlagi premikov goveda, ki so izvirala ali izhajala iz MAP pozitivnih rej, smo na omrežju prepoznali povezane reje in na podlagi volumna premikov in velikosti ter namembnosti rej določili reje, ki imajo višje tveganje za prisotnost ali pojav paratuberkuloze.

Bio-ekonomski model stroškov na ravni tipične črede krav molznic v Sloveniji je pokazal, da so na ravni živali pri subklinično in klinično okuženih kravah neposredne in posredne izgube povezane s paratuberkulozo znatne. Izgube so povezane predvsem s povečanim izločanjem klinično okuženih živali, povečano pojavnostjo kliničnega mastitisa in zaostale placentе ter znižano mlečnostjo. Pri subklinično okuženih živalih so izgube predvsem na račun zmanjšanih prihodkov, medtem ko so pri klinično okuženih živalih izgube predvsem na račun znatno povišanih stroškov, med katerimi je najbolj očitna strošek obnove črede. Zaradi relativno nizke prevalence paratuberkuloze v manjših čredah so bile izgube na ravni črede majhne. K izgubam na ravni črede so največ doprinesle subklinično okužene živali, ki jih je znatno več kot klinično okuženih.

Zaradi možnih posledic MAP za javno zdravje in s tem za povpraševanje in trgovanje ter posledično preživetje rejcev, smo pripravili oceno tveganja za izpostavljenost slovenskega potrošnika bakteriji MAP. Z upoštevanjem danih predpostavk in negotovosti smo ocenili, da je splošno tveganje za izpostavljenost MAP preko mleka in mlečnih izdelkov za slovenskega potrošnika nizko. Za ljudi, ki pijejo surovo mleko in uživajo izdelke iz surovega mleka s kmetij s paratuberkulozo, je tveganje izpostavljenosti MAP visoko, vendar je bila simulirana količina MAP na liter surovega mleka v cisterni relativno nizka. Medtem ko je tveganje za izpostavljenost preko pasteriziranega mleka v maloprodaji in preko drugega predelanega mleka najverjetneje zanemarljivo. Naši rezultati bi lahko zagotovili podporo za informirano odločanje o kontrolnih ukrepih MAP za znižanje tveganja za potrošnike. Kljub temu, da je znižanje tveganja izpostavljenosti MAP s prekuhavanjem mleka enostaven ukrep, je potrebno upoštevati dejstvo, da je človek lahko MAP izpostavljen tudi na številne druge načine in da relativen pomen posamezne za izpostavljenost človeka ni znan. Zato bi bilo potrebno, poleg priporočila, da naj se ranljive skupine izogibajo uživanju surovega mleka ali naj ga prekuhajo, vložiti potrebna sredstva in človeške vire v oblikovanje in izvedbo programa za nadzor paratuberkuloze v populaciji goveda v Sloveniji.

## 7 PRILOGE POROČILA

- Priloga 1.** Program dela in časovni načrt projekta.  
**Priloga 2.** Anketni vprašalnik  
**Priloga 3.** Pravilnik o pogojih za priznanje, pridobitev in vzdrževanje statusa črede, proste paratuberkuloze (Johnejeve bolezni) pri govedu.

## 8 VIRI

- Batagelj V, Mrvar A. Pajek - Program for Large Network Analysis. Ljubljana, Slovenia. <http://vlado.fmf.uni-lj.si/pub/networks/pajek/>.
- Bennett R, Christiansen K, Clifton-Hadley R (1999). Preliminary estimates of the direct costs associated with endemic diseases of livestock in Great Britain. *Prev Vet Med* 39: 155-71.
- Dijkhuizen AA, Morris RS (1997). *Animal Health Economics: principles and applications*. Sydney, University of Sydney, Post Graduate Foundation in Veterinary Science, p. 306.
- Fecteau EM (2017). Paratuberculosis in cattle. *Vet Clin Food Anim* 34(1): 209-22.
- Garcia AB, Shalloo L (2015) Invited review: The economic impact and control of paratuberculosis in cattle. *J Dairy Sci* 98: 5019-39.
- Groenendaal H, Wolf CA (2008). Farm-level economic analysis of the US national Johne's disease demonstration herd project. *J Am Vet Med Assoc* 233: 1852-8.
- Ho D: Notepad ++, Version 7.5.6 (2016), <https://notepad-plus-plus.org/>
- Kennedy DJ, Benedictus G (2001). Control of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in agricultural species. *Rev Sci Tech* 20(1): 151-79.
- Kušar D, Ocepek M, Logar K, Pate M, Krt B (2011). Seroprevalence of cattle paratuberculosis in Slovenia in 2008 and a comparison of data from current and previous studies. *Slov Vet Res* 48: 39-44.
- Logar K, Kopinč R, Bandelj P, Starič J, Lapanje A, Ocepek M (2012). Evaluation of combined high-efficiency DNA extraction and real-time PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in subclinically infected dairy cattle: comparison with faecal culture, milk realtime PCR and milk ELISA. *BMC Vet Res* 8: 1-22.
- Martins EG, Oliveira P, Oliveira BM, Mendonça D, Niza-Ribeiro J (2018). Association of paratuberculosis sero-status with milk production and somatic cell counts across 5 lactations, using multilevel mixed models, in dairy cows. *J Dairy Sci* 101(8):7638-49.
- Nielsen SS, Toft N (2009). A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Prev Vet Med* 88(1): 1-14.
- Ocepek M, Krt B, Pate M, Pogačnik M (2002). Seroprevalence of paratuberculosis in Slovenia between 1999 and 2001. *Slov Vet Res* 39: 179-85.
- Ocepek M, Pate M, Pirš T, Starič J. Paratuberkuloza: koliko nas bo stalo zapostavljanje te bolezni?. *Vestnik Veterinarske zbornice Slovenije* 9(4), 42-4.
- Ocepek M, Posedi J, Pislak M (1999). Prevalence of bovine paratuberculosis in Slovenia in 1997 and 1998. *Zb Vet Fak Univ Ljubljana* 36: 111-9.
- Ocepek M, Starič J, Ježek J, Logar K, Zajc U, Bandelj P, Pate M (2014b). Effect of vaccination against paratuberculosis on fecal shedding and productivity of heavily infected cattle herds. V: *Program & abstracts, 12th International Colloquium on Paratuberculosis, Parma, Italy, 22 - 26 June 2014*. Parma: International Association for Paratuberculosis, p. 148.

- Pillars RB, Grooms DL, Wolf CA, Kaneene JB (2009). Economic evaluation of Johne's disease control programs implemented in Michigan dairy farms. *Prev Vet Med* 90: 223–32.
- R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Home page <http://www.R-project.org>
- Ricchi M, De Cicco C, Kralik P, Babak V, Boniotti MB, Savi R, Cerutti G, Cammi G, Garbarino C, Arrigoni N (2014). Evaluation of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk using peptide-mediated separation and propidium monoazide qPCR. *FEMS Microbiol Lett* 356(1): 127-33.
- Rushton J (2009). *The economics of animal health and production*. Wallingford: CABI, p. 364.
- Smith RL, Schukken YH, Gröhn YT (2015). A new compartmental model of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection dynamics in cattle. *Prev Vet Med* 122: 298-305.
- Smith RL, Al-Mamun MA, Grohn YT (2017). Economic consequences of paratuberculosis control in dairy cattle: A stochastic modelling study. *Prev Vet Med* 183: 17-27.
- Starič J, Zadnik T, Logar K, Ocepek M (2011). Diagnostic of paratuberculosis on 8 big dairy farms in central Slovenia. In: Kos J, Samardžija M (Eds.). *Veterinarska stanica* 42, suppl. 1, 78-81.
- Waddell L, Rajić A, Stärk KD, McEwen SA (2016). *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* detection in animals, food, water and other sources or vehicles of human exposure: A scoping review of the existing evidence. *Prev Vet Med* 132: 32-48.
- Dijkhuizen AA, Morris RS. *Animal Health Economics: principles and applications*. Sydney, University of Sydney, Post Graduate Foundation in Veterinary Science, 1997: 306.
- Whittington et al., 2019
- Whitlock in Buergelt, 1996
- Lentz HHK. *Paths for Epidemics in Static and Temporal Networks: doctoral dissertation*. Humboldt University of Berlin, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, 2013.