

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2011-1/218

ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	J4-0176
Naslov projekta	Ugotavljanje povezave med bakterijo Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis pri živalih in Crohnovo boleznijo pri ljudeh
Vodja projekta	11133 Matjaž Ocepek
Tip projekta	J Temeljni projekt
Obseg raziskovalnih ur	4.653
Cenovni razred	C
Trajanje projekta	02.2008 - 01.2011
Nosilna raziskovalna organizacija	406 Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	312 Univerzitetni klinični center Ljubljana 381 Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta
Družbeno-ekonomski cilj	13. Splošni napredek znanja - RiR financiran iz drugih virov (ne iz splošnih univerzitetnih fondov - SUF)

1.1. Družbeno-ekonomski cilj¹

Šifra	08.
Naziv	Kmetijstvo

2. Sofinancerji²

1.	Naziv	
	Naslov	
2.	Naziv	
	Naslov	
3.	Naziv	
	Naslov	

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

3. Poročilo o realizaciji programa raziskovalnega projekta³

Crohnova bolezen (CB) je kronična vnetna črevesna bolezen, katere incidenca v zadnjem desetletju narašča predvsem v urbanih okoljih. Najpogosteje se pojavlja pri mladih ljudeh od 15. do 25. leta starosti, posamezni primeri pa tudi pri otrocih in v kasnejšem starostnem obdobju. Etiologija CB ni jasna. Obstajajo tri glavne teorije o možnem nastanku bolezni: 1) teorija avtoimunosti, 2) teorija imunske pomanjkljivosti in 3) teorija o mikobakterijah. Pri slednji kot morebitnega povzročitelja bolezni navajajo *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map), ki sicer povzroča paratuberkulozo pri živalih. CB je sistemsko obolenje, oboleli je v razviti fazi bolezni izredno težak bolnik. Zdravljenje bolezni je medikamentozno in zahteva multidisciplinarni pristop. Kadar je odgovor na zdravljenje nezadosten, je potrebna kirurška resekcija prizadetega dela črevesa. Letno v Sloveniji operiramo več kot 30 bolnikov.

Paratuberkuloza je kronična infekcijska bolezen prežvekovalcev, prizadene pa lahko tudi druge domače in divje živali. V živinoreji je bolezen pomembna zaradi velikih ekonomskih izgub, ki jih povzroča v okuženih rejah. Razširjena je po vsem svetu, tudi v Sloveniji.

Trenutna dognanja niso zadostna, da bi lahko z gotovostjo trdili, da Map povzroča nekatere oblike CB pri ljudeh. Hkrati obstaja veliko dejstev, ki kažejo na morebitno povezavo. V okviru projekta smo želeli predvsem:

- ugotoviti trenutno serološko prevalečo paratuberkulozo pri govejih čredah v Sloveniji,
- pri serološko pozitivnih živalih ugotoviti stopnjo izločanja Map v okolje (mleko, iztrebki), ugotavljati navzočnost in preživetje bakterije v okolju (predvsem v vodi in mlečnih izdelkih iz nepasteriziranega mleka),
- raziskati imunski odziv na antigene Map pri bolnikih s CB v Sloveniji,
- iz tkiv bolnikov s CB izolirati Map oziroma dokazati za Map specifično DNA v svežih tkivih po resekciji in v arhivskih parafinskih rezinah,
- molekularno tipizirati izolirane seve Map iz živali in ljudi in na tej podlagi primerjati njihovo genetsko zgradbo,
- izboljšati metode za ugotavljanje Map v vodi, tkivih in mleku.

Na začetku projekta smo v 20% čred iz različnih delov Slovenije na prisotnost protiteles proti Map testirali živali starejše od dveh let. Skupno smo z doma razvitim testom ELISA (antigen, Allied Monitor, ZDA), ki se je v predhodnih raziskavah izkazal za zelo občutljivega, vendar manj specifičnega, pregledali 38374 serumov živali iz 6780 govejih čred. Vse vzorce, ki so v našem testu reagirali pozitivno, smo dodatno preiskali še s komercialnim testom ELISA (Institut Pourquier, Francija). Kot pozitivne smo ovrednotili samo vzorce, ki so tudi v komercialnem testu reagirali pozitivno na protitelesa proti Map. Tako je bilo pozitivnih 228 (0,6%) živali iz 188 (2,8%) čred. Ugotovljena seroprevalenca je v primerjavi z večino evropskih držav zelo nizka, saj le-ta na nivoju rej običajno presega 50%. Ker smo predvidevali, da lahko zelo ugodne rezultate pripišemo predvsem dejstvu, da imamo v Sloveniji v povprečju le 5,7 živali starejših od dveh let na rejo, smo v nadaljevanju projekta serološko preiskali po 25 živali starejših od dveh let v 8 rejah krav molznic z več kot 200 govedi. Dodatno smo bakteriološko preiskali še vzorce mleka in iztrebkov teh živali ter po pet skupinskih vzorcev iztrebkov na rejo. V vseh 8 rejah smo potrdili živali s protitelesi proti Map (100% seroprevalenca), v polovici rej pa nam je uspelo potrditi tudi povzročitelja oziroma njegovo DNA. Ti rezultati kažejo, da moramo v Sloveniji nujno pripraviti ukrepe za nadzor paratuberkuloze, saj ta predstavlja velik problem v velikih rejah, ki so glavni vir oskrbe prebivalcev z mlečnimi izdelki.

Med serološko pozitivnimi rejami smo naključno, vendar s privoljenjem lastnikov, izbrali 10 rej brez kliničnih znamenj bolezni in tri reje s kliničnimi znamenji paratuberkuloze. V teh rejah smo vsem živalim odvzeli vzorce mleka, krvi in iztrebkov. Vzorce mleka in krvi smo vzporedno preiskali z metodo ELISA (Institut Pourquier), medtem ko smo vzorce iztrebkov preiskali z gojiščno in molekularno preiskavo.

V rejah s klinično negativnimi živalmi smo samo pri eni živali uspeli potrditi povzročitelja z gojiščno preiskavo. Molekularna preiskava je bila pri vseh živalih negativna. Serološko (preiskava mleka in krvi) je bila negativna samo ena reja. Rezultati ugotavljanja protiteles v mleku in krvi se pri posameznih živalih praviloma niso ujemali. Na drugi strani je bilo v rejah s klinično zaznavno paratuberkulozo bakteriološko pozitivnih kar 48% živali, medtem ko je bilo serološko pozitivnih samo 9% živali, pri katerih pa so se rezultati ugotavljanja protiteles v mleku in krvi večinoma ujemali.

S preiskavami smo ugotovili, da je bakteriološka preiskava vzorcev živali praviloma zanesljivejša od serološke, kjer je težava tako v občutljivosti kot tudi specifičnosti, saj je samo približno petina bakteriološko pozitivnih živali bila tudi serološko pozitivna, po drugi strani pa je desetina serološko pozitivnih živali izvirala iz rej brez kliničnih, bakterioloških ali epidemioloških pokazateljev paratuberkuloze.

Primerjava različnih metod je nakazala tudi slabo občutljivost molekularne preiskave, zato smo raziskave usmerili v izboljšanje izolacije in pomnoževanja DNA. Tako smo razvili oziroma optimizirali metode za izolacijo DNA iz tkiva, iztrebkov, krvi, mleka in sira. Skupna vsem metodam je kombinacija mehanske in encimske obdelave vzorcev. Pri vzorcih tkiva smo še posebej intenziven postopek izolacije uvedli za vzorce odvzete bolnikom s CB, kjer je bilo pričakovati še zlasti majhne količine iskane DNA.

Postopek za obdelavo tkiva bolnikov s CB: 25 mg težek košček prenesemo v epruveto, dodamo 200 µl pufru 2× TE in homogeniziramo z minipastulo. Vzorec izmenično pomakamo za 3 minute v tekoči dušik in za 3 minute v vodno kopel ogreto na 37°C. Nato vzorcju dodamo lizocim in inkubiramo 30 minut pri 37°C. Iz vzorca izoliramo DNA z mehansko homogenizacijo (zirconia/silica kroglice; MagNa Lyser, Roche) in uporabo komercialnega kita QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). Pri postopku za izolacijo iz tkiva živali zadostujeta mehanska homogenizacija in komercialni kit.

Izolacija DNA iz krvi: iz celokupne krvi bolnikov s CB (epruveta z antikoagulantom EDTA) izoliramo t. i. buffycoat s centrifugiranjem na gostotnem gradientu in s spiranjem vzorca z gojiščem RPMI in pufrom za lizo eritrocitov. Pelet resuspendiramo v 500 µl pufru PBS-A, prenesemo v epruveto MagnaLyser ter shranimo oziroma takoj nadaljujemo z zgoraj opisano izolacijo s tekočim dušikom, le da na koncu namesto QIAamp DNA Mini Kita uporabimo QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen). Pri vzorcju krvi živali ponovno izpustimo obdelavo z tekočim dušikom, vendar pa 5-krat povečamo količino vzorca (25 namesto 5 ml krvi).

Izolacija DNA iz iztrebkov: 10 g iztrebkov dodamo 30 ml sterilne destilirane vode in stresamo 30 minut na stresalniku. Mešanico pustimo stati 30 minut pri sobni temperaturi. 1 ml supernatanta odpipetiramo v epruveto MagnaLyser,

centrifugiramo 2 minuti pri 10000×g, supernatant odlijemo in ponovimo korak. Iz peletov nato izoliramo DNA z mehansko homogenizacijo (zirconia/silica kroglice) in uporabo komercialnega kita Smarthelex First DNAid (IFB). Izolacija DNA iz mleka: vzorce surovega mleka (50 ml) segrevamo v vodni kopeli 10 minut pri 95°C. Nato jih ohlajamo v ledeni kopeli 10 minut in centrifugiramo 30 minut pri 3100×g. Po centrifugiranju odstranimo sirotko, pelet in smetano na resuspendiramo v 0,75% HPC. Vzorec inkubiramo pri sobni temperaturi 30 minut in nato centrifugiramo 15 minut pri 2000×g. Po centrifugiranju odstranimo supernatant, vključno s smetano, pelet pa vorteksiramo in prenesemo v novo epruveto. Ponovno centrifugiramo 10 minut pri 14000×g in odstranimo ves supernatant in smetano. Iz peleta izoliramo DNA z mehansko homogenizacijo (zirconia/silica kroglice) in uporabo komercialnega kita QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen).

Izolacija DNA iz sira: v posebno vrečko s filtrom prenesemo 5 g sira in dodamo 45 ml na 37°C ogretega razredčevalca in stresamo v stomaherju 3 minute pri 260 rpm. Nato vzorce v navpičnem položaju inkubiramo 1 uro pri 37°C in ponovno stresamo v stomaherju 3 minute pri 260 rpm. Nato 40 ml emulzije prenesemo v sterilno 50-ml epruveto in centrifugiramo 15 minut pri 3000×g. Supernatant odlijemo in pelet resuspendiramo v 12 ml raztopine PBS-Tween. 10 ml suspenzije prenesemo v sterilno 15-ml epruveto (za izolacijo DNA), 2 ml pa porabimo za nasajanje gojišč. DNA nato izoliramo s komercialnim kitom firme Adiavet, po navodilih proizvajalca.

Navedeni postopki so se v kombinaciji z na novo razvito metodo pomnoževanja DNA v realnem času izkazali za zelo učinkovite.

Postopek pomnoževanja DNA v realnem času

Kvantitativni real-time PCR smo razvili na instrumentu LightCycler 2.0 za detekcijo za Map specifičnega insercijskega zaporedja IS900. Uporabili smo sondo TaqMan. Optimizirali smo reakcijsko mešanico in program pomnoževanja ter vpeljali tudi uporabo interne kontrole. Za določitev specifičnosti testa smo uporabili: dva referenčna seva Map iz zbirke ATTC, več sevov Map iz zbirke Veterinarske fakultete, 30 sevov različnih vrst mikobakterij iz zbirke ATTC in zbirke VF ter 15 sevov drugih bakterij, ki so običajno prisotne v prebavilih prežvekovalcev. Sevi Map so dali pozitiven rezultat, medtem ko so vsi ostali testirani sevi bakterij bili negativni. Eksperimentalna učinkovitost metode je 97,7%. Določena najnižja meja detekcije je dve plazmidni kopiji, kar smo določili v 66% reakcijah v dveh ponovitvah. Meja detekcije za določitev Map v mleku je 0,8 CFU/ml, za določitev Map v iztrebkih pa 2,4 CFU/g.

Po razvoju, vpeljavi in optimizaciji novih postopkov za izolacijo in pomnoževanje DNA smo v močno okuženi reji ponovno odvzeli vzorce mleka, krvi in iztrebkov. V mleku smo dokazali protitelesa pri eni (1,1%) živali, v serumu pa pri treh (2,1%) živalih. V krvi smo dokazali DNA Map pri dveh (1,4%) vzorcih, v mleku pri 38 (41,8%) in v iztrebkih pri 133 (94,3%) živalih. Pri tem je potrebno omeniti, da smo pri vseh postopkih za nadzor kontaminacije uporabljali negativne kontrole izolacije in pomnoževanja DNA, ki so bile vedno negativne. Bakteriološka preiskava, ki je bila ob prvem vzorčenju učinkovitejša od molekularne, je bila ob drugem vzorčenju pozitivna pri 27 (19,1%) vzorcev iztrebkov. Do razlike je verjetno prišlo zaradi močno povečane občutljivosti molekularne metode, ki se je potrdila tudi pri izvedbi medlaboratorijske kontrole s strani Veterinary Laboratory Agency (VB), kjer smo dosegli nadpovprečni rezultat, pa tudi zaradi manjšega števila bakterij v vzorcih, ki so posledica korektivnih ukrepov na farmi (razkuževanje napajalnikov, povečanje higiene, izločanje močno pozitivnih živali).

Z izboljšanjem predpriprave vzorcev in uvedbo novih tekočih gojišč z in brez dodatka rumenjaka smo poleg molekularne precej izboljšali tudi gojiščno preiskavo.

Tako nam je v dveh močno okuženih rejah uspelo izolirati Map iz večine skupinskih vzorcev iztrebkov in hlevu in iz posameznih vzorcev iztrebkov v bližnji okolici. Za širjenje okužbe je bilo še posebej zaskrbljujoče dejstvo, da smo Map izolirali iz vzorcev vode – napajalnikov v hlevu in iz vzorca iztrebkov na pašniku. Izolacija nam je uspela tudi iz več vzorcev mleka.

Da bi preverili obstojnost Map v siru, smo v reji ovc brez kliničnih znamenj paratuberkuloze pripravili 4 vzorce po 4 litre mleka. Dvema vzorcema smo dodali 500.000 CFU MAP, dvema pa 50.000.000 CFU Map (količina, ki jo lahko izloča okužena žival). Dva vzorca z različnimi količinami Map smo pred postopkom pridelave sira toplotno obdelali, dva vzorca pa smo pustili surova, saj je to pri domači pridelavi sira običajno. Po 9-mesečnem zorenju smo v vseh štirih vzorcih sira z metodo PCR v realnem času dokazali prisotnost DNA Map. Z gojiščno preiskavo nam je v vzorcu sira iz toplotno neobdelanega mleka in s 50.000.000 CFU dodanimi mikobakterijami uspela izolacija Map, ostali vzorci so bili negativni.

Z na novo vpeljano metodo tipizacije MIRU-VNTR smo preiskali seve izolirane iz govedi. Tipizacija je uspela pri 19 sevih, ki so bili razvrščeni v tri različne tipe.

Izolacija Map iz bolnikov s CB

Iz prvih 69 vzorcev tkiva po resekciji in 31 vzorcev krvi bolnikov s CB smo izolirali DNA s komercialnimi kiti za izolacijo DNA iz krvi in tkiva proizvajalca Qiagen. Za Map specifično DNA smo dokazali v dveh (2,9%) vzorcih tkiva in v 4 (12,9%) vzorcih krvi. Gojiščna preiskava vzorcev tkiva je bila negativna.

Po vpeljavi novih metod za izolacijo in pomnoževanje DNA smo pregledali še 47 vzorcev tkiva in 39 vzorcev krvi. Za Map specifično DNA smo dokazali v 18 (38,3%) vzorcih tkiva in v 11 (28,2%) vzorcih krvi. Preiskali smo tudi 37 vzorcev krvi od posameznikov brez znamenj CB in 20 vzorcev tkiva bolnikov z rakom na črevesju. Vsi vzorci so bili negativni na prisotnost za Map specifične DNA. Gojiščna preiskava teh vzorcev zaradi dolgotrajne inkubacije (15 mesecev) še ni zaključena.

Z metodo PCR smo DNA Map ugotavljali tudi v 139 vzorcih parafinskih rezin iz 32 bolnikov s CB in v 39 vzorcih parafinskih rezin kontrolne skupine (zdravi deli črevesja bolnikov z rakom na črevesju). Map je bil potrjen v 5 (3,6%) vzorcih, ki so pripadali 3 (9,4%) bolnikom s CB. Vse parafinske rezine kontrolne skupine so bile negativne na prisotnost DNA Map z metodo IS900 PCR.

Rezultati raziskav so nakazovali povezavo med CB in prisotnostjo Map v črevesju in krvi bolnikov s CB, ni pa bilo jasno, ali je bolezen povzročila prisotnost Map ali pa je Map pri teh bolnikih pogosteje prisotna zaradi boleznin in posledičnega zdravljenja. Zato smo v zadnjem delu projekta z dovoljenjem etične komisije, raziskave razširili na pediatrične bolnike, ki še niso bili zdravljeni. Tako smo z metodo PCR v realnem času preiskali kri in tkivo – biopsate 12 otrok s CB, 5 otrok z ulceroznim kolitisom in 17 otrok s črevesnimi težavami, vendar brez diagnoze kronične vnetne črevesne bolezni (KVČB). DNA Map smo potrdili v dveh vzorcih tkiva in dveh vzorcih krvi, pri štirih otrocih brez

KVČB. Tako prvi rezultati raziskave ne nakazujejo povezave med prisotnostjo Map in nastankom KVČB, vendar bodo za potrditev teh domnev potrebne preiskave večjega števila vzorcev.

Ker je po teoriji o imunski pomanjkljivosti za nastanek CB zelo pomembna genetska predispozicija smo izolirano DNA bolnikov s CB in kontrolne skupine preiskali na polimorfizme, ki vplivajo na dovzetnost za razvoj CB. Polimorfizme na genih SLC22A4 in SLC22A5 smo določali z metodo ločevanja alelov na instrumentu Abi Prism 7000 (Applied Biosystems), polimorfizme na lokusu G908R na genu NOD2/CARD15 pa z metodo PCR-REA. Vpeljali smo novo metodo SNaPshot za določanje točkastih mutacij na lokusu R702W na genu NOD2/CARD15. Točkaste mutacije smo analizirali na aparatu Abi Prism 310 (Applied Biosystems) z računalniškim programom ABI GeneScan. Za določanje mutacije 1007 insC na genu NOD2/CARD15 smo vpeljali metodo, ki temelji na analizi talilne temperature hibridov, ki nastanejo med produkti PCR in specifičnimi s fluorokromom-označenimi oligonukleotidi na instrumentu LightCycler 2.0 (Roche).

Od preiskanih vzorcev genomske DNA bolnikov s CB smo na genu SLC22A4 določili 46,8 % (22/47) heterozigotov in 25,5 % (12/47) homozigotov na polimorfizmih za možno dovzetnost za razvoj CB, pri 27,7 % (13/47) bolnikov pa nismo določili polimorfizmov ki so povezani z dovzetnostjo za CB na omenjenem genu. Na genu SLC22A5 smo določili 49 % (24/49) heterozigotov in 24,5 % (12/49) homozigotov, 26,5 % (13/47) bolnikov pa na omenjenem genu ni imelo polimorfizmov odgovornih za dovzetnost na CB. Pri kontrolni skupini smo določili na obeh genih (SLC22A4 in SLC22A5) manjši delež heterozigotnih in homozigotnih posameznikov na polimorfizmih, ki domnevno vplivajo na dovzetnost za razvoj CB. Na genu SLC22A4 smo pri kontrolni skupini določili 35,1 % (13/37) heterozigotnih in 16,2 % (6/37) homozigotnih posameznikov. Polimorfizmov nismo določili pri 48,6% (18/37) posameznikih. Na genu SLC22A5 smo določili 35,1 % (13/37) heterozigotnih in 18,9 % (7/37) homozigotnih posameznikov. Pri 46 % (17/37) posameznikov nismo določili polimorfizmov. Frekvenca polimorfizma T, ki določa domnevno dovzetnost za CB na genu SLC22A4 je višja pri bolnikih s CB in sicer 0,4877, medtem ko je pri kontrolni skupini frekvenca 0,3333. Frekvenca polimorfizma C na genu SLC22A5, odgovornega za domnevno dovzetnost na CB je pri bolnikih s CB 0,5123, pri kontrolni skupini pa je nižja in sicer 0,3750. Na genu NOD2/CARD15 smo določili le heterozigote za vse tri alelne variante, in sicer 11,8 % (6/51 %) za varianto 1007 insC, 4,7 % (2/43 %) za G908R alel in najmanjši delež 3,7 % (2/54 %) za R702W. Pri kontrolni skupini nismo določili nobene alelne variante na genu NOD2/CARD15. Frekvenca alelov na genu NOD2/CARD15, ki določajo domnevno dovzetnost je na vseh lokusih višja pri bolnikih s CB kot pri kontrolni skupini in sicer na lokusu 908 0,0185, na lokusu 1007 0,0741, pri kontrolni skupini pa na lokusu 908 nismo našli alela, ki povzroča domnevno dovzetnost za CB, na lokusu pa je bila frekvenca 0,0139. Iz rezultatov lahko domnevamo, da omenjeni polimorfizmi verjetno določajo dovzetnost za CB, vendar so po vsej verjetnosti prisotni tudi drugi do sedaj neznani polimorfizmi, kakor tudi drugi negenski dejavniki.

Pri bolnikih s CB, smo opravili tudi osnovno HLA tipizacijo. Izkazalo se je, da med bolniki znaša relativna frekvenca HLA A-1 27%, HLA A-2 42%, HLA A-3 17%, HLA A-25 0,5%, ter za HLA A-11, HLA A-23 in HLA A-24 0,25%. Pri tipu C so relativne frekvence 22% za podtip 7, 20% za podtipa 4 in 6, 12% za podtipa 2 in 3, 0,5% za podtip 1, ter 0,25% za podtipe 8,12,in 15.

Za ugotavljanje imunskega odziva na antigene Map pri bolnikih s CB smo razvili metodo ELISA. Vsi bolniki, odgovorijo s prisotnostjo specifičnih protiteles IgG proti antigenom MAP. Pri nadaljnji analizi lahko ugotovimo, da imajo bolniki, pri katerih smo v krvi dokazali povzročitelja, najvišjo raven protiteles.

4. Ocena stopnje realizacije zastavljenih raziskovalnih ciljev⁴

Realizirali smo vse poglobitve raziskovalne cilje.

Ugotovili smo seroprevalenco paratuberkuloze v Sloveniji, ki je relativno nizka v primerjavi z ostalimi evropskimi državami. Z dodatnimi raziskavami pa smo dokazali, 100% seroprevalenco v 8 preiskanih velikih rejah krav molznic, iz česar lahko sklepamo, da paratuberkuloza pomembno negativno vpliva na ekonomičnost reje prežvekovalcev v Sloveniji.

Ovrednotili smo diagnostično vrednost seroloških testov v primerjavi z gojiščno in molekularno preiskavo.

Potrdili smo domneve, da v močno okuženih rejah živali masovno izločajo Map v okolico. Tako smo povzročitelja dokazali praktično v vseh odvzetih vzorcih v hlevu in celo v okolici hleva ter na pašniku.

Živali Map izločajo tako z iztrebki, kot tudi z mlekom, kar je še posebej zaskrbljujoče, saj je znano, da lahko Map preživi tudi pasterizacijo mleka. V našem poskusu smo dokazali da je Map preživel postopek pridelave in devet mesečno zorenje sira.

Tekom projekta smo izboljšali postopek gojiščne preiskave s postopkom dodatne obdelave vzorcev iztrebkov, mleka in sira pred nasajanjem in z uvedbo dodatnih tekočih gojišč.

Še poseben pomen pri izboljšanju zanesljivosti diagnostike paratuberkuloze pa ima razvoj nove zelo učinkovite metode molekularne preiskave, ki vključuje tako močno izboljšane in optimizirane postopke izolacije DNA iz različnih vzorcev, kot tudi učinkovito in specifično pomnoževanje DNA v realnem času.

Vpeljali smo novo metodo molekularne tipizacije mikobakterij – MIRU-VNTR, ki nam bo tudi v bodoče omogočila epidemiološke raziskave in mednarodno primerljivost naših izolatov.

V arhivskih parafinskih rezinah, tkivih in krvi bolnikov s CB smo dokazali prisotnost MAP, medtem ko jo pri odrasli kontrolni skupini nismo dokazali.

Pri bolnikih s CB smo ugotovili več polimorfizmov, ki naj bi določali dovzetnost za CB kot pri kontrolni skupini.
Razvili smo metodo ELISA, s katero smo določali imunski odziv bolnikov s CB na antigene Map. Vsi bolniki, od katerih smo v preiskave prejeli vzorčni material, odgovorijo s prisotnostjo specifičnih protiteles IgG proti antigenom MAP. Pri nadaljnji analizi lahko ugotovimo, da imajo bolniki, pri katerih smo v krvi dokazali povzročitelja z molekularnimi metodami, najvišjo raven protiteles.
V okviru projekta je bila sprejeta tema doktorske naloge, ki je v zaključni fazi izdelave.

5. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine⁵

Ni bilo sprememb.

6. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁶

		Znanstveni rezultat	
1.	Naslov	SLO	Tipizacija sevov M. avium izoliranih iz ljudi in živali z metodo MIRU-VNTR:Heterogenost M. avium subsp. hominissuis - homogenost M. avium subsp. avium
		ANG	MIRU-VNTR typing of M. avium in animals and humans:Heterogeneity of M. avium subsp. hominissuis - homogeneity of M. avium subsp. avium strains.
	Opis	SLO	Z novo in hitro genotipizacijsko metodo MIRU-VNTR smo analizirali 121 izolatov M. avium subsp. avium (Maa) in hominissuis (Mah), ki so že bili tipizirani z metodo RFLP. Želeli smo primerjati moč ločljivosti obeh metod ter ugotoviti, če so izbrani MIRU-VNTR markerji primerni za tipizacijo izolatov M. avium iz omejenega geografskega področja. To je bila prva MIRU-VNTR tipizacija Maa okoljskih izolatov. Z MIRU-VNTR smo ugotovili, da so izolati Mah relativno heterogeni v primerjavi z Maa, zato so za razvoj primerne MIRU-VNTR tipizacijske sheme za Maa potrebne nadaljnje raziskave.
		ANG	With new and rapid genotyping techniques, MIRU-VNTR, 121 previously RFLP typed M. avium isolates of the subsp. avium (Maa) and hominissuis (Mah) were analyzed to compare the discriminatory power of both methods and to find if the selected markers were suitable for the M. avium typing from a limited geographic area. This was the first MIRU-VNTR typing of Maa field isolates. A relative heterogeneity of Mah isolates was discovered in comparison to homogeneity of Maa when using MIRU-VNTR, therefore further investigations are necessary to develop a suitable MIRU-VNTR typing scheme for Maa.
	Objavljeno v	PATE, Mateja, KUŠAR, Darja, ŽOLNIR-DOVČ, Marija, OCEPEK, Matjaž. MIRU-VNTR typing of Mycobacterium avium in animals and humans:Heterogeneity of Mycobacterium avium subsp. hominissuis versus homogeneity of Mycobacterium avium subsp. avium strains. Res. Vet. Sci., article in press, doi: 10.1016/j.rvsc.2010.10.001.	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
COBISS.SI-ID	3276410		
2.	Naslov	SLO	Inaktivacija bakterij vrste Mycobacterium avium paratuberculosis v ovčjem gnoju
		ANG	Inactivation of Mycobacterium avium paratuberculosis in sheep manure
	Opis	SLO	Bakterije MAP smo vnesli v kompostno mešanico, in sicer v tri aktivno zračene in izolirane kompostne sode in v kup ovčjega gnoja. Z gojiščno preiskavo smo ugotavljali njihovo preživetje, z metodo PCR za IS900 pa prisotnost njihove DNA. Med kompostiranjem smo v kompostnem materialu ugotavljali temperaturo, pH vsebnost vlage, dušika, amonijaka in pepela. Rezultati kažejo, da kompostiranje bistveno reducira število bakterij in je tako uporaben pri preprečevanju širjenja MAP v okolju.
ANG		MAP was inoculated into the compost in three actively ventilated and isolated vessels and in a conventional manure storage pile. The presence of MAP growth and MAP DNA was investigated with culture and IS900 PCR. Moisture, ash and ammonia content in the compost and manure specimens were determined and pH was measured. The results showed that manure composting can eradicate or at least drastically reduce the number of	

		pathogenic microorganisms, and therefore it can be used as a preventive measure against spreading of MAP into the environment.
	Objavljeno v	GOBEC, Ivan, OCEPEK, Matjaž, POGAČNIK, Milan, DOBEIC, Martin. Inactivation of Mycobacterium avium paratuberculosis in sheep manure. Slov. vet. res. [English ed.], 2009, vol. 46, no. 3, str. 105-113.
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID	3125882
3.	Naslov	<i>SLO</i> Patologija kronične vnetne črevesne bolezni
		<i>ANG</i> Pathology of the inflammatory bowel disease
	Opis	<i>SLO</i> Pregledni članek, ki obravnava predvsem diagnostično morfologijo ulceroznega kolitisa, Crohnove bolezni in indeterminiranega sindroma. Povzame tudi patogenezo in zaplete, s poudarkom na neoplaziji. Navedena je tudi diferencialna diagnostika.
		<i>ANG</i> A review paper is treating diagnostic pathology of ulcerative colitis, Crohn's disease and indeterminate syndrome. Complications and pathogenesis are also summarized. Differential diagnoses are treated extensively.
	Objavljeno v	DOLENC-STRAŽAR, Zvezdana, CERAR, Anton. Patologija kronične vnetne črevesne bolezni = Pathology of the inflammatory bowel disease. Med. razgl. (Tisk. izd.). [Tiskana izd.], dec. 2010, letn. 49, št. 4, str. 445-460, ilustr.
	Tipologija	1.02 Pregledni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID	28091609
4.	Naslov	<i>SLO</i> Določanje DNA Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis v arhivskih parafinskih rezinah tkiva bolnikov s Crohnovo boleznijo
		<i>ANG</i> Detection of M. avium subsp. paratuberculosis DNA isolated from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue of Chron's disease patients
	Opis	<i>SLO</i> Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (Map) velja za najbolj verjetnega infekcijskega povzročitelja Crohnove bolezni (CB), saj je povzročitelj zelo podobne bolezni pri živalih, tudi primatih. Na prisotnost Map smo z IS900 PCR testirali arhivske, v formalinu fiksirane parafinske rezine črevesnega tkiva slovenskih bolnikov s CB in kontrolne vzorce od bolnikov s kolorektalnim rakom. Map smo določili pri 12 % bolnikov s CB in nobenem vzorcu od posameznikov brez CB. Naši rezultati potrjujejo današnje vedenje o Map kot možnem etiološkem agensu CB, tudi pri slovenskih bolnikih.
		<i>ANG</i> Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (Map) has been the most enduring infectious candidate to be proposed as a causative agent of Crohn's disease (CD), since it causes a very similar disease in animals, including primates. For the presence of Map, the archival formalin-fixed, paraffin-embedded intestinal tissues of CD Slovenian patients and control specimens of individuals without CD were tested by IS900 PCR. Map was detected in 12 % of the CD patients and none of the controls. Our findings contribute to the current knowledge about Map being a possible etiological agent of CD.
	Objavljeno v	LOGAR, Katarina, CERAR, Anton, JERUC, Jera, DOLENC-STRAŽAR, Zvezdana, FERME, Darja, PATE, Mateja, ŠVARA, Tanja, OCEPEK, Matjaž. Detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis DNA isolated from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue of Chron's disease patients. Proceedings of the 10th International Colloquium on Paratuberculosis, Minneapolis, Minnesota, 2009. Program and abstracts : 10 ICP. Minneapolis: International Association for Paratuberculosis, 2009, str. 68-71.
	Tipologija	1.08 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci
	COBISS.SI-ID	3180154
5.	Naslov	<i>SLO</i> Serološka prevalenca paratuberkuloze pri govedu v Sloveniji
		<i>ANG</i> Seroprevalence of paratuberculosis in cattle in Slovenia
	Opis	<i>SLO</i> Ugotavljali smo seroprevalenco paratuberkuloze pri govedu v Sloveniji. Pregledanih je bilo 38.374 serumov govedi, starejših od dveh let, iz 6.780 rej, kar predstavlja približno 20% rej v Sloveniji. Serološko pozitivnih je bilo 228 (0,59%) živali iz 188 (2,77%) rej. V primerjavi z večino evropskih držav je v Sloveniji zelo malo rej s serološko pozitivnimi živalmi, kar je delno posledica majhnega števila živali na rejo.
		Seroprevalence of paratuberculosis in cattle herds in Slovenia was estimated. Animals older than two years in 20 % of herds of Slovenia were tested in

	ANG	2008. A total of 38,374 sera from 6,780 cattle herds were examined in ELISA test. A total of 228 (0.59 %) animals from 188 (2.77 %) herds were positive. Currently, the seroprevalence of paratuberculosis in cattle herds in Slovenia is almost the same as it was in 1997 (2.77 % vs. 2.84 %). Compared to the majority of European countries, the herd prevalence is rather low. This could be partly attributed to a small number of animals per herd.
Objavljeno v		CEPEK, Matjaž, POGAČNIK, Milan, LOGAR, Katarina, FERME, Darja, PATE, Mateja, KRT, Branko. Seroprevalence of paratuberculosis in cattle in Slovenia. Proceedings of the 10th International Colloquium on Paratuberculosis, Minneapolis, Minnesota, 2009. Program and abstracts : 10 ICP. Minneapolis: International Association for Paratuberculosis, 2009, str. 73-75.
Tipologija	1.08	Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci
COBISS.SI-ID		3180410

7. Najpomembnejši družbeno-ekonomsko relevantni rezultati projektne skupine⁶

Družbeno-ekonomsko relevantni rezultat		
1.	Naslov	SLO Primerjava testov ELISA v vzorcih mleka in seruma, ter gojiščne in molekularne preiskave iztrebkov.
		ANG Comparison of milk and serum ELISA, faecal culture and PCR in Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infected herds.
Opis	SLO	Rezultati so pokazali, da sta serološka testa verjetno premalo specifična in občutljiva. Samo 1/5 bakteriološko potrjenih živali je bila tudi serološko pozitivna, medtem ko 1/10 serološko pozitivnih živali izvira iz rej prostih paratuberkuloze. Gojiščna preiskava iztrebkov pa se je izkazala za najzaneslivejšo metodo, saj je bila bolj občutljiva od gojiščne preiskave.
	ANG	Our results indicate that serological Map-testing might lack sensitivity and specificity. On one hand, approx. only 1/5 animals assigned with Map-positive result of faecal culture/PCR and on the other hand, approx. 1/10 animals originating from herds without the present or previous reports on the presence of Map, tested serologically positive. In our case, faecal culture showed to be the most reliable method for the detection of Map-positive animals in herds with paratuberculosis, because PCR detection exerted lower sensitivity.
Šifra		B.03 Referat na mednarodni znanstveni konferenci
Objavljeno v		KUŠAR, Darja, LOGAR, Katarina, ZAJC, Urška, KRT, Branko, AVBERŠEK, Jana, OCEPEK, Matjaž. Comparison of milk and serum ELISA, faecal culture and PCR in Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infected herds. V: KUŠAR, Darja (ur.), BIDOVEC, Urška (ur.). 31st Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, 4-7 July, 2010, Bled, Slovenia. Abstract book. Golnik: Bolnišnica - Klinični oddelek za pljučne bolezni in alergijo; Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2010, str. 182, PP-90.
Tipologija		1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci
COBISS.SI-ID		3227770
2.	Naslov	SLO Strategija zdravstvenega varstva živali od 2010 do 2017
		ANG Animal health strategy from 2010 to 2017
Opis	SLO	V strategiji so izpostavljene živalske kužne bolezni za katere se pričakuje, da bodo v obdobju 2010 do 2017 najbolj ogrožale zdravje živali. Med njimi je bila posebej izpostavljena paratuberkuloza.
	ANG	The strategy encompasses animal infectious diseases which are expected to represent the most serious threat to animal health in the period from 2010 to 2017. A special stress was put on paratuberculosis.
Šifra		B.06 Drugo
Objavljeno v		ZEMLIČ, Borut, PODPEČAN, Ožbalt, FATUR, Bogomil, ZORMAN-ROJS, Olga, VALENČAK, Zdravko, VENGUŠT, Modest, HROVATIN, Breda, HOSTNIK, Peter, TOZON, Nataša, LINDTNER-KNIFIC, Renata, DOVČ, Alenka, POSEDI, Janez, ZDOVC, Irena, OCEPEK, Matjaž, KRT, Branko, LOGAR, Katarina. Strategija zdravstvenega varstva živali od 2010 do 2017. Vestnik Veterinarske zbornice Slovenije, 2010, letn. 5, št. 2, str. 16-30.

	Tipologija	1.04	Strokovni članek
	COBISS.SI-ID	3195258	
3.	Naslov	SLO	Eksperimentalni modeli gastrointestinalnih bolezni - naše izkušnje.
		ANG	Experimental models of gastrointestinal diseases - our experience
	Opis	SLO	Prikazani so najpogosteje uporabljeni modeli kemično induciranih pogostih bolezni prebavil (epitelijski tumorji želodca in kolorektuma, kronična vnetna črevesna bolezen). Kratek pregled sloni na literaturi in lastnih izkušnjah avtorjev.
		ANG	Some of the most frequent chemically induced models of gastrointestinal diseases (colorectal and gastric epithelial tumors, inflammatory bowel disease) are presented. The brief review is based on the literature and authors' own experiences.
	Šifra	B.03 Referat na mednarodni znanstveni konferenci	
	Objavljeno v	PERŠE, Martina, CERAR, Anton. Experimental models of gastrointestinal diseases - our experience. V: LUZAR, Boštjan (ur.), VIZJAK, Alenka (ur.), VOLAVŠEK, Metka (ur.), POPOVIČ, Mara (ur.), FRANCHI, Alessandro (ur.). XLI. memorialni sestanek prof. Janeza Plečnika z mednarodnim simpozijem, 2.-3. 12 2010. Novosti v patologiji : ob 70-letnici Inštituta za patologijo MF UL: 70th anniversary of the Institute of Pathology, MF, UL. V Ljubljani: Inštitut za patologijo, MF, 2010, str. 67-73, ilustr.	
	Tipologija	1.09	Objavljeni strokovni prispevek na konferenci
COBISS.SI-ID	28006873		
4.	Naslov	SLO	Mikobakteriologija na Veterinarski fakulteti Ljubljana: pretekli dosežki in bodoči izzivi
		ANG	Mycobacteriology at Veterinary faculty Ljubljana: past achievements and future challenges.
	Opis	SLO	Predstavljeno je bilo raziskovalno delo na področju mikobakterij s poudarkom na metodah idetekcije in determinacije. Še posebej je bila izpostavljena molekularna tipizacija mikobakterij iz sklopa M. avium.
		ANG	Research work in the field of mycobacteria was presented, including the methods of detection and determination and with a special focus on genotyping of mycobacteria of M. avium complex.
	Šifra	B.03 Referat na mednarodni znanstveni konferenci	
	Objavljeno v	PATE, Mateja, OCEPEK, Matjaž. Mycobacteriology at Veterinary faculty Ljubljana: past achievements and future challenges. V: Veterinary network of laboratories researching into improved diagnosis and epidemiology of mycobacterial diseases, Torino, 17th - 20th June 2009. Final meeting Torino : abstracts 2009. Torino: VENO MYC, 2009, str. [34].	
	Tipologija	1.12	Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci
COBISS.SI-ID	3079802		
5.	Naslov	SLO	Urednik zbornika 31. kongresa Evropskega združenja mikobakteriologov
		ANG	Editor of the Abstract book of 31st Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology
	Opis	SLO	Sourednica zbornika povzetkov 31. letnega kongresa mikobakteriologov. V zborniku je na 227 straneh objavljenih 177 prispevkov na temo diagnostike mikobakterij.
		ANG	Coeditor of the Abstract book of 31st Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology. In Abstract book were published 177 contributions from the field of mycobacteriology.
	Šifra	C.01 Uredništvo tujega/mednarodnega zbornika/knjige	
	Objavljeno v	31st Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, 4-7 July, 2010, Bled, Slovenia, KUŠAR, Darja (ur.), BIDOVEC, Urška (ur.). Abstract book. Golnik: Bolnišnica - Klinični oddelek za pljučne bolezni in alergijo; Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2010. 227 str. ISBN 978-961-6633-28-4.	
	Tipologija	2.30	Zbornik strokovnih ali nerecenziranih znanstvenih prispevkov na konferenci
COBISS.SI-ID	251575040		

8. Drugi pomembni rezultati projektne skupine⁸

B.1 Organizator znanstvenega srečanja

M. Ocepek Organizator – predsednik 31. kongresa Evropskega združenja mikobakteriologov (Bled 4.-7.7.2010)

A. Pleskovič Organizator – predsednik 11. Kongresa endoskopske kirurgije Slovenije (Ljubljana, 23.-25.3.2011)

D 01, D 03, E 02 Vodenje delov mednarodnih projektov, članstvo v mednarodnih odborih, nagrade

VENoMYC (Veterinary Network of Laboratories Researching into Improved Diagnosis and Epidemiology of Mycobacterial Diseases), 6. Okvirni program 2003-2009; Projektni partner M. Ocepek nacionalni coordinator za Slovenijo,

C.06

M. Ocepek Član uredniškega odbora Slovenskega veterinarskega zbornika (viri: <http://www.esmycobacteriology.eu/index.html>, Sicris, <http://www.slovetres.si/>)

F21, F22; Razvoj novih in izboljšanje obstoječih diagnostičnih postopkov

M. Ocepek, M. Pate: Razvoj in vpeljava molekularne diagnostike za detekcijo povzročiteljev tuberkuloze, paratuberkuloze in bruceloze v kliničnih vzorcih in za detekcijo bakterij *C. botulinum* in *B. anthracis* v vzorcih okolja. ter vpeljava številnih drugih molekularnih metod za dokazovanje in determinacijo povzročiteljev bakterijskih bolezni živali. Razvoj metode za dokazovanje toksigenih sevov *C. difficile* v kliničnih vzorcih s pomnoževanjem DNA v realnem času. Vpeljava in izboljšanje postopkov molekularne tipizacije bakterij (RFLP, VNTR, PFGE). (Dokumenti Veterinarske fakultete UL, COBISS)

Pintar T. Minimalno invazivna tehnika transanalne resekcije pri bolnikih s Hirschsprungovo boleznijo. Oskrba bolnikov z venskimi valvulami z namenom prehrane in onkološkega zdravljenja.

Pleskovič A., Pintar T. Bariatrična kirurgija.

Jelenc F. Laparaskopska kirurgija debelega črevesa.

Sprejet članek za objavo v Slovenskem veterinarskem zborniku z naslovom "Seroprevalence of paratuberculosis in cattle in Slovenia", avtorjev: Darja Kušar, Katarina Logar, Mateja Pate, Brane Krt, Matjaž Ocepek

9. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁹

9.1. Pomen za razvoj znanosti¹⁰

SLO

Razvoj in optimizacija novih postopkov izolacije DNA, kakor tudi razvoj zelo učinkovite metode pomnoževanja DNA v realnem času predstavljata pomemben prispevek k razvoju diagnostike paratuberkuloze v svetovnem merilu, saj še vedno ne obstaja zanesljiva komercialno dostopna metoda za diagnostiko paratuberkuloze.

Primerjava testa ELISA vzorcev seruma, testa ELISA vzorcev mleka, gojiščne in molekularne preiskave, ki je pokazala, da sta serološka testa v rejah s klinično paratuberkulozo neprimerljivo (do 50x) slabše občutljiva od gojiščne in molekularne preiskave, medtem ko se v rejah brez klinične slike paratuberkuloze medsebojno ne ujemata in sta po vsej verjetnosti samo 90% specifična, je pomembna v mednarodnem merilu, saj so si dosednji rezultati primerjav precej nasprotujoči in pogosto temeljijo na zastarelih metodah. Rezultati raziskav pri bolnikih s CB kažejo na povezavo med prisotnostjo Map v črevesju in krvi ter CB. Za potrditev vzročne povezave bodo potrebne nadaljnje študije. Določitev polimorfizmov, ki določajo genetsko predispozicijo bolnikov s CB v Sloveniji, pomeni pomemben del mozaika pri globalnem poznavanju nastanka CB.

ANG

Development and optimization of new DNA extraction procedures and development of new highly efficient DNA amplification using real time PCR represent an important contribution to the development of paratuberculosis diagnostics on international level as there is still no reliable method for diagnostics of paratuberculosis commercially available. Comparison of serum ELISA, milk ELISA, culture method and molecular tests showed markedly (up to 50-times) lower sensitivity of serological tests compared to culture and molecular

methods used in herds with clinical paratuberculosis. In herds with latent paratuberculosis, milk and serum ELISA gave discrepant results and have most probably only 90% specificity. These findings are important on international level as up to date comparison results are contradictory and frequently based on out-of-date methods. The results of the study on CD patients indicate a link between the presence of Map in the intestines and blood and CD. However, to demonstrate the causative link further studies are needed. Detection of polymorphisms which determine genetic predisposition of CD patients in Slovenia represents an important piece of global knowledge on the etiology of CD.

9.2. Pomen za razvoj Slovenije¹¹

SLO

Z raziskavami v okviru projekta smo ugotovili, da so velike reje krav molznic v veliki meri okužene z Map. To narekuje takojšnjo pripravo ukrepov za nadzor bolezni na državni ravni, saj lahko paratuberkuloza v nasprotnem primeru ogrozi ekonomičnost okuženih rej, ki imajo pomemben delež pri mlečni proizvodnji v Sloveniji. V močno okuženih rejah smo že med projektom pripravili ukrepe, ki so delno omejili izgube zaradi paratuberkuloze in tako pripomogli k ohranjanju mlečne proizvodnje v teh rejah.

Izboljšana diagnostika paratuberkuloze bo pripomogla k lažjemu in hitrejšemu odkrivanju okuženih živali oziroma rej in s tem k učinkovitejšemu zatiranju bolezni. Učinkovita diagnostika, ki je sicer pri paratuberkulozi dandanes v svetovnem merilu slaba, je predpogoj za zainteresiranost rejcev za ukrepe, ki zaradi narave bolezni šele na daljši rok prinesejo zadovoljive učinke.

S poznavanjem izločanja mikobakterij v okolje in njihovega preživetja v okolju in živilih, ki smo jih pridobili v okviru projekta, lahko bolje predvidimo kritične točke za širjenje okužb, pa tudi potencialno nevarnost živil za zdravje ljudi. Na tej podlagi lahko predlagamo ukrepe za zmanjšanje širjenja bolezni in ne nazadnje za varnejšo hrano.

ANG

In the scope of this project it was demonstrated that large herds of dairy cattle are infected with Map to a large extent. This calls for immediate preparation of control measures on the state level as paratuberculosis may endanger the economy of infected herds which represent an important share of milk production in Slovenia. In heavily infected herds, the measures were implemented already during the project to partially limit the losses due to paratuberculosis and to preserve milk production in these herds.

Improved diagnostics of paratuberculosis will contribute to easier and faster detection of infected animals/herds and to more efficient suppression of the disease. Efficient diagnostics (which is nowadays mostly unsatisfactory) is a prerequisite to motivate the cattle breeders for implementation of the control measures as these will bring satisfactory effects on a long term only.

Knowledge on shedding of mycobacteria and their survival in the environment and in food will help us to detect critical points for spread of the infection and potential danger of the food for public health. On this basis, the measures for limiting the spread of disease and providing safer food may be proposed.

10. Samo za aplikativne projekte!

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

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

	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.04	Dvig tehnološke ravni	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.05	Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.06	Razvoj novega izdelka	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.07	Izboljšanje obstoječega izdelka	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.08	Razvoj in izdelava prototipa	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.09	Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.10	Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.11	Razvoj nove storitve	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.12	Izboljšanje obstoječe storitve	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>

	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.13	Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.14	Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.15	Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.16	Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.17	Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.18	Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.19	Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.20	Ustanovitev novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.21	Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>

F.22	Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.23	Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.24	Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.25	Razvoj novih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.26	Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.27	Prispevek k ohranjanju/varovanju naravne in kulturne dediščine	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.28	Priprava/organizacija razstave	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.29	Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.30	Strokovna ocena stanja	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.31	Razvoj standardov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE

	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.32	Mednarodni patent	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.33	Patent v Sloveniji	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.34	Svetovalna dejavnost	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.35	Drugo	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>

Komentar

--

11. Samo za aplikativne projekte!

Označite potencialne vplive oziroma učinke vaših rezultatov na navedena področja

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

G.02.08.	Povečanje dobička	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.09.	Nova delovna mesta	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.11.	Nov investicijski zagon	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.12.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03	Tehnološki razvoj					
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.04.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04	Družbeni razvoj					
G.04.01	Dvig kvalitete življenja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.02.	Izboljšanje vodenja in upravljanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.03.	Izboljšanje delovanja administracije in javne uprave	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.04.	Razvoj socialnih dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.05.	Razvoj civilne družbe	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.06.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.05.	Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in identitete					
G.06.	Varovanje okolja in trajnostni razvoj					
G.07	Razvoj družbene infrastrukture					
G.07.01.	Informacijsko-komunikacijska infrastruktura	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.02.	Prometna infrastruktura	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.03.	Energetska infrastruktura	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.04.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.08.	Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva					
G.09.	Drugo:					

Komentar

--

12. Pomen raziskovanja za sofinancerje, navedene v 2. točki [12](#)

1.	Sofinancer	
	Vrednost sofinanciranja za celotno obdobje trajanja projekta je znašala:	EUR
	Odstotek od utemeljenih stroškov projekta:	%
	Najpomembnejši rezultati raziskovanja za sofinancerja	Šifra

	1.		
	2.		
	3.		
	4.		
	5.		
Komentar			
Ocena			
2.	Sofinancer		
Vrednost sofinanciranja za celotno obdobje trajanja projekta je znašala:			EUR
Odstotek od utemeljenih stroškov projekta:			%
Najpomembnejši rezultati raziskovanja za sofinancerja			Šifra
	1.		
	2.		
	3.		
	4.		
	5.		
Komentar			
Ocena			
3.	Sofinancer		
Vrednost sofinanciranja za celotno obdobje trajanja projekta je znašala:			EUR
Odstotek od utemeljenih stroškov projekta:			%
Najpomembnejši rezultati raziskovanja za sofinancerja			Šifra
	1.		
	2.		
	3.		
	4.		
	5.		
Komentar			
Ocena			

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, za objavo 6., 7. in 8. točke na spletni strani <http://sicris.izum.si/> ter obdelavo teh podatkov za evidence ARRS
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki
- so z vsebino zaključnega poročila seznanjeni in se strinjajo vsi soizvajalci projekta

Podpisi:

Matjaž Ocepek	in	
podpis vodje raziskovalnega projekta		zastopnik oz. pooblaščen oseba RO

Kraj in datum:

Ljubljana

22.4.2011

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2011-1/218

¹ Zaradi spremembe klasifikacije družbeno ekonomskih ciljev je potrebno v poročilu opredeliti družbeno ekonomski cilj po novi klasifikaciji. [Nazaj](#)

² Samo za aplikativne projekte. [Nazaj](#)

³ Napišite kratko vsebinsko poročilo, kjer boste predstavili raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja ter rezultate in učinke raziskovalnega projekta. Največ 18.000 znakov vključno s presledki (približno tri strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

⁴ Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

⁵ V primeru bistvenih odstopanj in sprememb od predvidenega programa raziskovalnega projekta, kot je bil zapisan v predlogu raziskovalnega projekta oziroma v primeru sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine v zadnjem letu izvajanja projekta (obrazložitev). V primeru, da sprememb ni bilo, to navedite. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

⁶ Navedite največ pet najpomembnejših znanstvenih rezultatov projektne skupine, ki so nastali v času trajanja projekta v okviru raziskovalnega projekta, ki je predmet poročanja. Za vsak rezultat navedite naslov v slovenskem in angleškem jeziku (največ 150 znakov vključno s presledki), rezultat opišite (največ 600 znakov vključno s presledki) v slovenskem in angleškem jeziku, navedite, kje je objavljen (največ 500 znakov vključno s presledki), izberite ustrezno šifro tipa objave po Tipologiji dokumentov/del za vodenje bibliografij v sistemu COBISS ter napišite ustrezno COBISS.SI-ID številko bibliografske enote. Navedeni rezultati bodo objavljeni na spletni strani <http://sicris.izum.si/>.

PRIMER (v slovenskem jeziku):

Naslov: Regulacija delovanja beta-2 integrinskih receptorjev s katepsinom X;

Opis: Cisteinske proteaze imajo pomembno vlogo pri nastanku in napredovanju raka. Zadnje študije kažejo njihovo povezanost s procesi celičnega signaliziranja in imunskega odziva. V tem znanstvenem članku smo prvi dokazali... (največ 600 znakov vključno s presledki)

Objavljeno v: OBERMAJER, N., PREMZL, A., ZAVAŠNIK-BERGANT, T., TURK, B., KOS, J.. Carboxypeptidase cathepsin X mediates $\beta 2$ - integrin dependent adhesion of differentiated U-937 cells. Exp. Cell Res., 2006, 312, 2515-2527, JCR IF (2005): 4.148

Tipologija: 1.01 - Izvirni znanstveni članek

COBISS.SI-ID: 1920113 [Nazaj](#)

⁷ Navedite največ pet najpomembnejših družbeno-ekonomsko relevantnih rezultatov projektne skupine, ki so nastali v času trajanja projekta v okviru raziskovalnega projekta, ki je predmet poročanja. Za vsak rezultat navedite naslov (največ 150 znakov vključno s presledki), rezultat opišite (največ 600 znakov vključno s presledki), izberite ustrezen rezultat, ki je v Šifrantu raziskovalnih rezultatov in učinkov (Glej: <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/sifranti/sif-razisk-rezult.asp>), navedite, kje je rezultat objavljen (največ 500 znakov vključno s presledki), izberite ustrezno šifro tipa objave po Tipologiji dokumentov/del za vodenje bibliografij v sistemu COBISS ter napišite ustrezno COBISS.SI-ID številko bibliografske enote.

Navedeni rezultati bodo objavljeni na spletni strani <http://sicris.izum.si/>. [Nazaj](#)

⁸ Navedite rezultate raziskovalnega projekta v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 6 in 7 (npr. ker se ga v sistemu COBISS ne vodi). Največ 2.000 znakov vključno s presledki. [Nazaj](#)

⁹ Pomen raziskovalnih rezultatov za razvoj znanosti in za razvoj Slovenije bo objavljen na spletni strani: <http://sicris.izum.si/> za posamezen projekt, ki je predmet poročanja. [Nazaj](#)

¹⁰ Največ 4.000 znakov vključno s presledki [Nazaj](#)

¹¹ Največ 4.000 znakov vključno s presledki [Nazaj](#)

¹² Rubrike izpolnite/prepišite skladno z obrazcem "Izjava sofinancerja" (<http://www.arrs.gov.si/sl/progproj/rproj/gradivo/>), ki ga mora izpolniti sofinancer. Podpisan obrazec "Izjava sofinancerja" pridobi in hrani nosilna raziskovalna organizacija – izvajalka projekta. [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-RPROJ-ZP/2011-1 v1.01
DE-72-39-C2-7B-7A-FF-16-FC-FE-E4-0B-BD-62-B9-97-D9-79-53-9F