Izdvajanje i proširenost bakterije Gallibacterium anatis na farmama kokoši nesilica u Hrvatskoj

Liyemo, Alphius Mahoto

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:820521

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Veterinary Medicine - Repository of PHD, master's thesis

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

VETERINARSKI FAKULTET

Alphius Mahoto Liyemo

Izdvajanje i proširenost bakterije *Gallibacterium anatis* na farmama kokoši nesilica u Hrvatskoj

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Zavod: Zavod za bolesti peradi s klinikom

Predstojnik Zavoda: doc. dr. sc. Željko Gottstein

Mentori: 1. doc. dr. sc. Željko Gottstein

2. doc. dr. sc. Danijela Horvatek Tomić

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada

1. Dr. sc. Gordana Nedeljković, MMSc, dr. med. vet.

2. Doc. dr. sc. Danijela Horvatek Tomić

3. Doc. dr. sc. Željko Gottstein

4. Prof. dr. sc. Estella Prukner-Radovčić (zamjena)

Sadržaj

1. UVOD 1
2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA 3
2.1. PATOGENEZA 3
2.2. PRIJENOS BOLESTI 3
2.3. KLINIČKA SLIKA 4
2.4. ČIMBENICI VIRULENCIJE 5
2.4.1. RTX- like toxin GtxA 5
2.4.2. Fimbrije 5
2.4.3. *Outer membrane vesicles* (OMV) 5
2.4.4. Kapsula 6
2.4.5. Metaloproteaze 6
2.4.6. Hemaglutinacija 6
2.5. DIJAGNOSTIKA 6
2.6. PREVENCIJA I LIJEČENJE 7
3. MATERIJALI I METODE 9
3.1. Uzorkovanje 9
3.2. Bakteriološka pretraga 9
3.3. Statističke analize 9
4. REZULTATI 10
5. RASPRAVA 14
6. ZAKLJUČCI 16
7. LITERATURA 17
8. SAŽETAK 21
9. SUMMARY 22
10. CURRICULUM VITAE 23

1. UVOD

Bakterija *Gallibacterium (G.) anatis* je oportunistička patogena bakterija koja se može izdvojiti iz peradi, prvenstveno one držane u intenzivnim uvjetima. U čistoj kulturi može se izdvojiti iz zaraženih tovnih pilića ili roditeljskih jata, te je zadnjih godina opisana i kao emergentna patogena bakterija. Bakterija *G. anatis* je Gram negativna, štapićasta, nepokretna, fakultativno anaerobna bakterija koja stvara kapsulu a ubrajamo ju u porodicu *Pasteurellaceae* (CHRISTENSEN i sur., 2003). Dijelimo ju na dva biovara: *G. anatis haemolytica* i *G. anatis anatis*, koja ujedno nije hemolitična. β- hemoliza vidljiva je na agaru obogaćenom ovčjom ili goveđom krvi, a same kolonije su glatke, sivo boje, neprozirne, sjajne i okrugle, promjera 1-2 mm nakon 24-48 sati rasta pri 37°C (PERSSON i BOJESEN, 2015).

Kjos-Hansen je 1950. prvi izdvojio ovu bakteriju iz kloake zdravih pilića, pod imenom *„cloaca bacterium"* (ATAEI i sur., 2016). Na početku je klasificirana kao *Pasteurella salpingitis* (KOHLERT, 1968), da bi zatim MRAZ (1976) predložio reklasifikaciju u *Actinobacillus salpingitidis*, temeljem fenotipskih karakteristika. U zadnjih nekoliko desetljeća često je mijenjano ime ove bakterije, od *Pasteurella haemolytica*, *Actinobacillus salpingiditis* do *Pasteurella anatis,* da bi na kraju rod bio nazvan *Gallibacterium*.

Godine 1982. BISGAARD je predložio naziv *Gallibacterium* kao samostalni rod. Kasnije je taj isti rod uključen u porodicu *Pasteurellaceae* temeljem sekvenci 16s rRNA gena (CHRISTENSEN i sur., 2003). Rod se trenutno sastoji od sedam grupa s različitim vrstama povezanih sličnostima sekvenci 16S rRNA gena, te fenotipskim karakteristikama. Vrste koje danas ubrajamo u ovaj rod su *G. anatis, G. melopsittaci*, *G. salpingitidis*, *Gallibacterium genospecies* III, *Gallibacterium* group V i *G. trehalosifermentans* (CHRISTENSEN i sur., 2003; BISGAARD i sur., 2009).

Bakterija *G. anatis* pripada normalnoj mikroflori gornjeg dišnog sustava i donjeg genitalnog sustava pilića i drugih ptica kao što su purani, golubovi, prepelice, fazani i divlje ptice (BISGAARD, 1993). Osim peradi, ovu bakteriju nalazimo i u svinja i goveda, a dokazan je i njezin nalaz u imunokompromitiranih pacijenata, no ipak se rijetko javlja u ljudi sa dobrim zdravstvenim navikama (SINGH i sur., 2016). Ubrajamo ju u komenzalne bakterije gore spomenutih organskih

sustava, no ipak u određenim uvjetima postoji opasnost uzrokovanja bolesti i gubitaka u proizvodnji (PAUDEL i sur., 2014)

Ukoliko dođe do pojave bolesti, najčešće se javlja salpingitis, peritonitis, septikemija, perikarditis i enteritis (CHRISTENSEN i sur., 2011). Ovu bakteriju nalazimo diljem svijeta, te je izdvojena iz zdrave peradi u Europi, Africi, Aziji, Australiji i Americi.

2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1. PATOGENEZA

Bakteriju *G. anatis* ubrajamo u normalnu mikrofloru gornjeg dišnog i donjeg reproduktivnog sustava zdrave peradi. Izdvojena je iz dušnika i kloake tijekom pokusih istraživanja (BISGAARD, 1979). I *G. anatis* i tzv. *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC) mogu uzrokovati iste kliničke znakove, kao što su salpingitis, peritonitis, perikarditis, ooforitis, hepatitis, enteritis i septikemiju, što otežava postavljanje etiološke dijagnoze (NEUBAUER i sur., 2009). Istraživanja su dokazala da *G. anatis* ima sposobnost zaražavanja više organa istovremeno, te je tako izdvojena iz srca, jetre, slezene i spolnog sustava nakon inokulacije u dišni i donji spolni sustav (NEUBAUER i sur., 2009). Također može uzrokovati pad proizvodnje jaja, bez pojave ostalih simptoma, za razliku od npr. *Pasteurella multocida* (CHRISTENSEN i sur., 2003). Smatra se da je ascedentna infekcija glavni način širenja bolesti na spolni sustav, jetru i slezenu, što je i dokazano intraperitonealnom inokulacijom *Gallibacterium* u pilića (BOJESEN i sur., 2004).

Nespecifični klinički znakovi i nedostatak patognomoničnih simptoma otežavaju postavljanje ante-mortem dijagnoze, dok se postmortalni nalaz često može usporediti s onim prisutnim kod korice peradi, newcastleske bolesti ili influence (CHRISTENSEN i sur., 2003). Istraživanja su pokazala da *G. anatis* ima sposobnost uzrokovati promjene u spolnom sustavu bez pojave kliničkih znakova. Predisponirajući čimbenici uključuju i koinfekcije sa drugim mikroorganizmima, utjecaj hormona, dob, stres i toplotni stres te imunološki status. Težina kliničkih znakova, trajanje bolesti i mortalitet ovise o čimbenicima okoliša kao što su loša higijena, neprikladna ventilacija, visoka razina amonijaka i prisutnost drugih bolesti (PAUDEL i sur., 2015).

2.2. PRIJENOS BOLESTI

Bakterije roda *Gallibacterium* mogu se prenositi horizontalno i vertikalno, no horizontalni prijenos je ipak češći. Bakterije ulaze u organizam putem respiratornog ili genitalnog sustava. Intranazalna

inokulacija u tzv. *specific pathogen free* (SPF) pilića pokazala je da ove bakterije imaju mogućnost širenja u različite organe, uglavnom spolnog sustava, gdje su uzrokovale pojavu lezija sličnim onima u prirodnim infekcijama.

Smatra se da se vertikalni prijenos odvija putem zaražene sperme pijetlova. PAUDEL i sur. (2015) dokazali su prisutnost *G. anatis* u testisima i epididimisu pijetlova dobi 35 tjedana nakon intranazalne inokulacije. Bakterija je bila izdvojena i 7 dana nakon inokulacije, što dokazuje mogućnost vertikalnog prijenosa. Morfološki deformirani spermiji uočeni su, zajedno sa općenito lošijom kvalitetom sperme.

Dokazan je i transovarijalni prijenos, što potvrđuje i izdvajanje iz žutanjka. Na širenje *G. anatis* od mjesta ulaska po cijelom organizmu utječu druge prisutne bolesti, čimbenici okoliša, imunosupresija ili kanibalizam (NEUBAUER i sur., 2009; PAUDEL i sur., 2014). Istraživači su uspjeli izdvojiti ove bakterije iz jaja, što također dokazuje moguć transovarijalni prijenos. Pilići su manje prijemljivi za zarazu bakterijama roda *Gallibacterium* (BISGAARD, 1977).

2.3. KLINIČKA SLIKA

Depresija, proljev i pad proizvodnje jaja uočavaju se na vrhuncu proizvodnje, no slični se klinički znakovi mogu naći i kod kokcidioze, zaraznog bronhitisa, zarazne korice, newcastleske bolesti, influence ili kolere. Zaraza donjeg dijela spolnog sustava uzrokuje pad proizvodnje jaja, atrofiju folikula, deformacije jaja i razlike u njihovoj veličini, kao i povećani mortalitet zbog pojave peritonitisa. Ponekad bolest se može pojaviti u obliku akutne septikemije sa naglim mortalitetom u zdravih nesilica. Gnojni salpingitis i ooforitis se također mogu zamijetiti. U kroničnom obliku bolest se javlja u vidu lokaliziranog ili generaliziranog gnojnog peritonitisa (HATEM i sur., 2016; SINGH i sur., 2016).

2.4. ČIMBENICI VIRULENCIJE

Čimbenici virulencije opisani su kao dijelovi mikroorganizma koji omogućuju pojavu bolesti i određuju patogenost istog, te su neophodni za njegovu održivost (PERSSON i BOJESEN, 2015). To su čimbenici koji pridonose pojavi bolesti, kolonizaciji, boljem iskorištavanju hranjivih tvari, izbjegavanju imunosnog sustava i adheziji molekula. Bakterija *G. anatis* posjeduje slijedeće čimbenike virulencije: RTX- *like toxin GtxA*, fimbrije, kapsulu, *outer membrane vesicles* (OMV), metaloproteaze i sposobnost hemaglutinacije.

2.4.1. RTX- like toxin GtxA

Bakterija *G. anatis* biovar haemolytica stvara toksine koji imaju sposobnost uzrokovati široke beta-hemolitične zone na krvnom agaru. Tu hemolizu uzrokuje toksin nazvan GtxA a koji razara eritrocite i ima leukotoksično djelovanje prema makrofazima peradi. Ovaj toksin stvaraju bakterije porodie *Pasteurellaceae* (PERDERSEN i sur., 2015).

2.4.2. Fimbrije

Bakterija *G. anatis* posjeduje fimbrije koje su značajan čimbenik tijekom invazije i kolonizacije, ali također pomažu bakteriji u prihvaćanju za epitelne stanice domaćina. Fimbrije su tanke nitaste strukture na površini bakterija, slične tzv. f17 fimbrijama. U *G. anatis* tipu IV nalazimo i pile koji pomažu u unutarstaničnom kretanju, formiranju mikrokolonija, kolonizaciji i sekreciji proteaza (SINGH i sur., 2016).

2.4.3. *Outer membrane vesicles* (OMV)

OMV su sferične, dvoslojne membranske strukture koje stvaraju Gram negativne bakterije. Imaju ulogu u interakciji s okolišem, omogućujući bakteriji preživljavanje u stresnim uvjetima i reguliraju mikrobne interakcije unutar bakterijske populacije. Glavna uloga OMV je u prihvaćanju, kolonizaciji i zaštiti bakterijske stanice (SINGH i sur., 2016).

2.4.4. Kapsula

Kapsula je struktura koju čine vanstanični polisaharidi, a može se naći u Gram pozitivnih i negativnih bakterija. Kapsula doprinosi pojavi bolesti, ali i štiti samu bakteriju od makrofaga. Ima ulogu i u prihvaćanju, interakciji sa drugim stanicama i izbjegavanju imunosnog sustava domaćina (SINGH i sur., 2016).

2.4.5. Metaloproteaze

Metaloproteaze imaju vitalnu ulogu u kolonizaciji, korištenju hranjivih tvari, izbjegavanju imunosnog sustava i ulasku bakterija u sistemsku cirkulaciju. To su enzimi koji kataliziraju hidrolizu peptidnih veza u proteinima ili peptidima. Bakterija *G. anatis* također ima sposobnost stvaranja biofilma što omogućava prihvaćanje na površine živih tkiva i ima značaju ulogu u patogenezi i pojavi kroničnih infekcija, uz pojačanu neosjetljivost na antimikrobne pripravke (SINGH i sur., 2016).

2.4.6. Hemaglutinacija

Bakterija *G. anatis* ima sposobnost aglutinirati eritrocite ptica. Ova aktivnost uglavnom ovisi o tipu adhezije, filamentoznoj ili nefilamentoznoj. Koji od ova dva oblika posjeduje *G. anatis* još je uvijek nepoznato (SINGH i sur., 2016).

2.5. DIJAGNOSTIKA

Dijagnoza se može postaviti temeljem izdvajanje ove bakterije, fenotipskim i genotipskim metodama. Klinički znakovi i postmortalni nalazi nisu dovoljni za postavljanje specifične dijagnoze jer su mogući i u drugih zaraznih bolesti. U slučaju nalaza beta-hemolitičnih biovarova, bakterije će dobro rasti na agarima obogaćenim krvlju, uz pojavu klasičnih zona hemolize promjera 1-2 mm nakon 24-satne inkubacije. Identifikacija se temelji na morfološkim karakteristikama i biokemijskim testovima, no danas se zbog brzine i točnosti dijagnostike koristite metode kao što su PCR ili *matrix- assisted laser desorption/ionization time of flight* (MALDI-TOF).

Najbolji način identifikacije *G.anatis* je dokaz fenotipskih karakteristika ili umnažanjem GAN850 pozicije unutar 16s rRNA. Ova bakterija, u usporedbi sa drugim iz porodice *Pasteurellaceae* posjeduje drugačiju transkripciju 16s u 23s rRNA sekvenci gena. PCR metoda uz specifične početnice za identifikaciju roda također je korisna u dijagnostici (BOJESEN i sur., 2007). Osim PCR-a, i *amplified fragment length polymorphism* (AFLP) kao i elektroforeza u pulsirajućem polju (PFGE) mogu se koristiti za razlikovanje klonova *G. anatis*, omogućavajući prepoznavanje različitih specifičnih patogenih sojeva (BOJESEN i sur., 2007).

Tzv. *Fluorescent in situ hybridization technique* (FISH) se također koristi u identifikaciji pojedinačnih bakterijskih stanica. Ova se metoda temelji na fluorescentnom obilježavanju oligonukleotida komplementarnih bakterijskom 16s rRNA. Prednost ove metode je da može razlikovati žive i mrtve (ne-kulturabilne) stanice bakterija. Trenutno postoje naznake razvoja dva serološka testa (latex aglutinacije i imunoenzimnog testa) radi dokaza specifičnih protutijela protiv G. *anatis*.

2.6. PREVENCIJA I LIJEČENJE

Dobra higijena tijekom proizvodnje i pridržavanje biosigurnosnih mjera na samoj farmi značajno će smanjiti širenje bolesti i ekonomske gubitke koji bi nastali liječenjem. Samo ona jata držana u optimalnim uvjetima vjerojatno će biti slobodna od *G. anatis*. Jednom kad ova bakterija uđe u farmu, doći će do širenja na sve jedinke, zbog vrlo učestalog horizontalnog načina širenja. Nepostojanje komercijalno dostupnog cjepiva otežava kontrolu ove bolesti. U istraživanju koje su proveli BOJESEN i sur. (2003 a, b) dokazali su da su hemolitične *Gallibacterium* spp. bile često prisutne na farmama sa niskom ili umjerenom biosigurnosnom zaštitom, što ukazuje na to da su veliki rizik za pojavnost ove bakterije uvjeti držanja i biosigurnosti.

Razvoj prikladnih cjepiva predstavlja izazov za istraživače zadnjih desetljeća zbog postojanja različitih varijacija genoma mikroorganizama (PERSSON i sur., 2010; CHAVEZ i sur., 2017). Zbog toga, istraživanja su uglavnom temeljena na identifikacija dijelova mikroorganizama koji bi predstavljali prikladne antigene za razvoj samih cjepiva. To je dovelo do razvoja genomskih cjepiva i možebitnog tzv. *reverse vaccinology* (RV) pristupa. Trenutno se taj pristup koristi u otkrivanju potencijalnih kandidata za cjepiva (BAGER i sur., 2014).

Pokus proveden na kokošima radi dokaza imunosnog odgovora nakon intraperitonealne inokulacije rekombinantnog proteina GtxA-N bakterija roda *Gallibacterium* pokazao je da taj protein može biti prikladan kandidat za cjepivo jer je potaknuto zaštitni odgovor protiv *G. anatis* (PERDERSEN i sur., 2015).

Zbog nepostojanja prikladnih cjepiva, antimikrobna terapija se često koristi u kontroli ove bolesti, no *G. anatis* vrlo brzo razvija rezistenciju na primijenjene lijekove. Česta je multirezistentnost *G. anatis* na tetracikline, streptomicin, trimetoprim, te penicilin (JOHNSON i sur., 2013; SINGH i sur., 2016). Neki autori navode da je *G. anatis* osjetljjiva na gentamicin, enrofloksacin, ceftiofur, florfenikol, sulfametoksazol/trimetoprim i sulfatiazol, dok drugi navode rezistenciju na iste preparate. Na spektinomicin je često umjereno osjetljiva, dok su za amoksicilin i eritromicin nalazi također različiti (JONES i sur., 2013).

Da bi se smanjila pojava rezistentnih sojeva, potrebno je smanjiti i uporabu antimikrobnih pripravaka ili kontrolirati njihovo korištenje. Smanjenju pojave rezistencije može doprinijeti i korištenje autogenih cjepiva pripremljenih od specifičnih sojeva *G. anatis* prisutnih na farmi. Također, proizvođači moraju popraviti biosigurnosne mjere i spriječiti širenje ovih bakterija u objektima. Obavezna je i primjena principa "*all in-all out*", a nakon pražnjenja objekta potrebno je provesti temeljito čišćenje, dezinfekciju i dovoljno dugi period odmora.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorkovanje

Lešine kokoši nesilica dostavljene su sa 7 različitih farmi na Zavod za bolesti peradi s klinikom, Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Provedena je patomorfološka pretraga, te su uzeti obrisci slijedećih organa da daljnje pretrage: ždrijela, dušnika, pluća, jetre, jajovoda, jajnika i koštane srži. Također, neki su uzorci uzeti na farmama, od nasumično odabranih živih životinja, u vidu obrisaka ždrijela i kloake. Uzorci su korišteni i za dokaz drugih bakterija, primarno *E. coli*.

3.2. Bakteriološka pretraga

Uzorci su u bakteriološkom laboratoriju nasađeni na krutu podlogu obogaćenu sa 5% ovčje krvi (Biognost, Hrvatska) i Columbia agar (Oxoid, Velika Britanija), te inkubirani u aerobnim uvjetima pri 37ºC kroz 24 sata. Kolonije okružene ß-hemolizom, uz karakterističan izgled, su presađene nakon čega su provedene i druge metode identifikacije- bojenje po Gramu i biokemijski testovi (oksidaza (T.T.T., Hrvatska) i katalaza). Konačna potvrda obavljena je korištenjem MALDI-TOF metode (ALISPAHIĆ i sur., 2012). Uzorci su nakon identifikacije spremljeni na -80°C u BHI bujonu (Oxoid, Velika Britanija) radi daljnjih analiza.

3.3. Statističke analize

Dobiveni rezultati statistički su obrađeni korištenjem programa Statistica 12 (Statsoft, SAD).

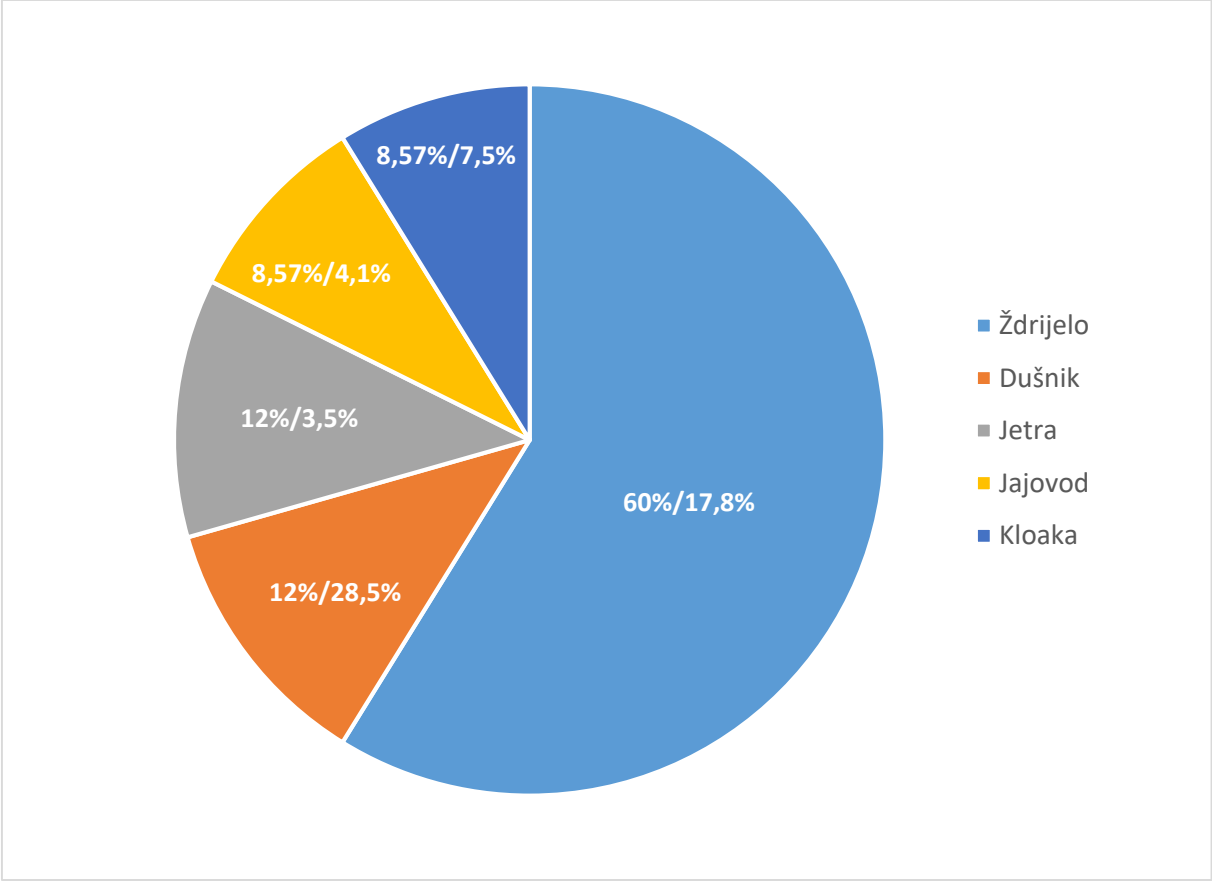
4. REZULTATI

Od 414 prikupljena uzorka, njih, 35 bilo je pozitivno na *G. anatis* (Tablica 1). Od ukupno pozitivnih uzoraka, 60% bilo je iz uzoraka ždrijela, 12% iz dušnika i jetre, te 9% uzoraka jajovoda i kloake (Slika 1). Također, visok postotak uzoraka uzetih u gornjem dišnom sustavu bili su pozitivni (17,8 % uzoraka ždrijela i 28,5% uzoraka dušnika), dok su uzorci unutarnjih organa bili pozitivni u puno manjem postotku, tj. manje od 5%. Isto tako, čak 60% pozitivnih uzoraka potjecalo je od uginulih, a 40% od živih životinja (Slika 2).

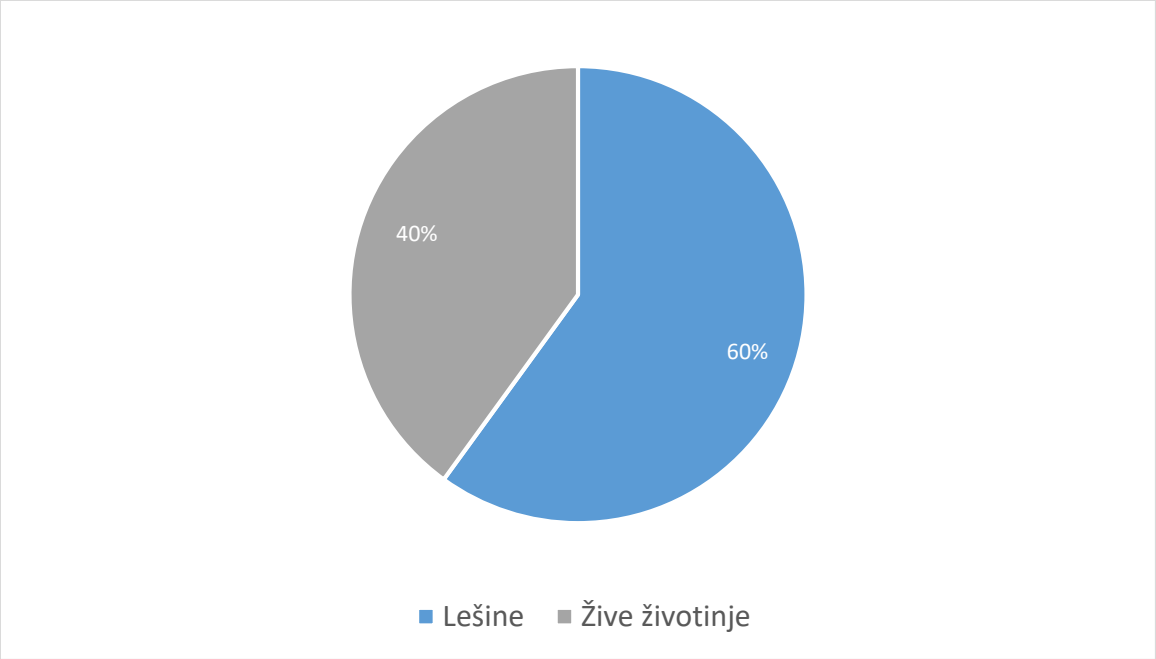
U nekim slučajevima, *G. anatis* izdvojena je u čistoj kulturi i iz uzoraka uginulih životinja, iako su u većini takvih slučajeva, bakterije roda *Proteus* sp. prerasle hranjive podloge (Slika 3a). Stoga su takvi uzorci obilježeni kao negativni jer nije bilo moguće izdvojiti čistu *G. anatis*. U nekim slučajevima zabilježen je istovremeni nalaz *G. anatis* i *E. coli*, ali i drugih saprofitskih bakterija, posebno iz uzoraka ždrijela (Slika 3b). Tako je u 35 pozitivnih uzoraka na *G. anatis*, u 7 od njih nađena i *E. coli*, što potvrđuje koinfekciju.

Tablica 1. Pojavnost izolata *G. anatis* na različitim farmama, u različitim organima (pozitivno/ukupan broj uzoraka)

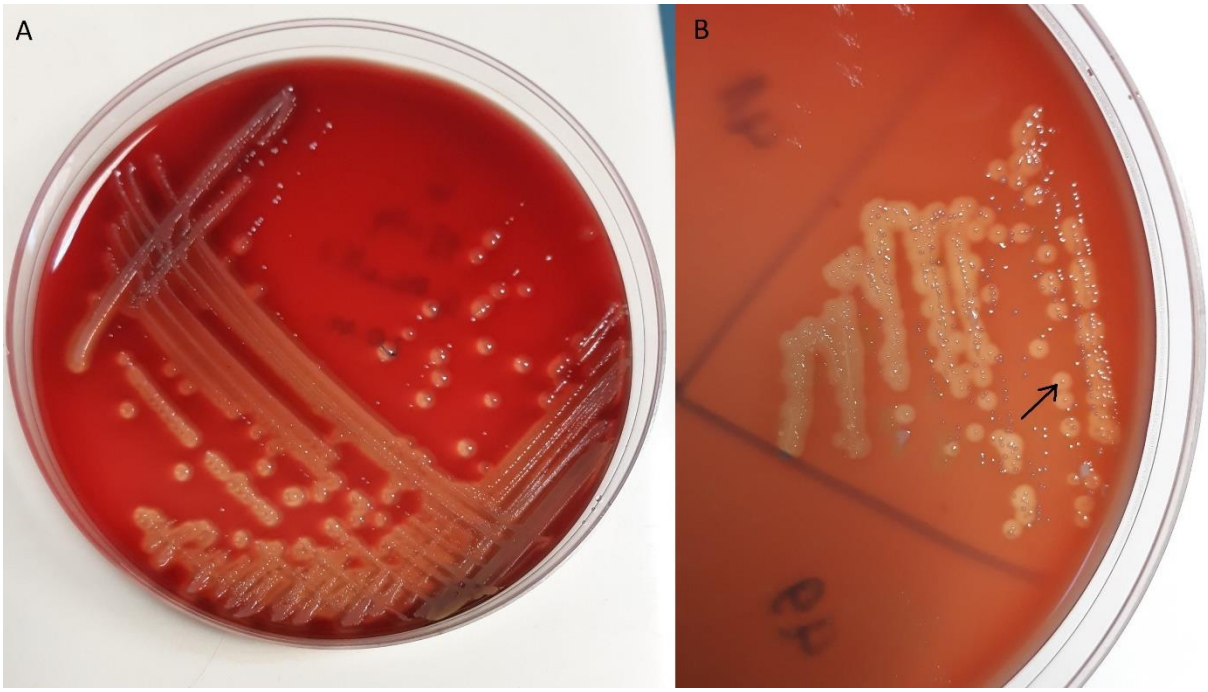
Farme kokoši nesilica	Vrsta uzorka								Ukupan broj pozitivnih/ ukupan broj uzoraka po farmi(% pozitivnih uzoraka)
	Ždrijelo	Dušnik	Jetra	Jajovod	Kloaka	Pluća	Koštana srž	Jajnik	
Farma 1	3/16	-	0/13	0/9	0/16	0/2	0/7	0/2	3/65 (4%)
Farma 2	0/7	-	3/36	-	-	-	0/8	-	3/51 (5%)
Farma 3	2/7	-	0/4	-	0/7	-	0/6	-	2/24 (8%)
Farma 4	6/37	0/2	0/32	1/27	3/16	0/3	0/10	0/4	10/131 (7%)
Farma 5	3/20	2/10	1/13	0/22	0/1	-	0/5	0/2	6/73 (8%)
Farma 6	6/29	2/2	0/14	2/12	-	0/1	0/5	0/1	10/64 (15%)
Farma 7	1/2	-	0/2	0/2	-	-	-	-	1/6 (16%)
Ukupan broj pozitivnih uzoraka/ukupan broj uzoraka organa (% od ukupno pozitivnih / % od ukupnog broja po organu)	21/118 (60%/ 17, 8%)	4/14 (12%/ 28, 5%)	4/114 (12%/ 3, 5%)	3/72 (8, 5%/ 4, 1%)	3/40 (8, 5%/ 7, 5%)	0/6	0/41	0/9	35/414 (8%)



Slika 1. Pojavnost *G. anatis* u različitim organima (% ukupno pozitivnih / % od ukupnog broja uzoraka po organu).



Slika 2. Postotak *G. anatis* izdvojen iz lešina i živih životinja.



Slika 3. Kolonije *G. anatis* na krutoj podlozi obogaćenoj s 5% ovčje krvi. (A) Čista kultura. (B) Mješovita kultura- *G. anatis* vidljive zone ß hemolize.

5. RASPRAVA

Gallibacterium anatis je bakterija prisutna u gornjem dišnom te donjem genitalnom sustavu peradi, te predstavlja uobičajen nalaz mikroflore. U slučaju pojave stresa i držanja peradi u lošim higijenskim uvjetima, može uzrokovati i pojavu bolesti (BISGAARD, 1993). Često se javlja uz *E. coli*, pri čemu dolazi i do većeg mortaliteta, uz pojavu salpingitisa, ooforitisa, i pada nesivosti (NEUBAUER i sur., 2009). Loši zoohigijenski uvjeti, ventilacija i stres imaju značajnu ulogu u pojavi bolesti (PAUDEL i sur., 2015). Ova bakterija dobro raste na krvnom agaru, sa dodatkom ovčje ili goveđe krvi, pri 37 °C kroz 24-48 sati. Porasle kolonije su sjajne, sivkaste i okrugle promjera 1-2 mm, uz vidljivu zonu β- hemolize (BOJESEN, 2015).

Glavni cilj ovog istraživanja bio je izdvojiti i karakterizirati sojeve *G. anatis*, te determinirati njezinu proširenost u jatima kokoši nesilica u Republici Hrvatskoj. U istraživanju, bakterije su izdvojene na krvnom agaru i identificirane na temelju njihovih fenotipskih i genotipskih karakteristika. Metoda MALDI-TOF također je korištena za identifikaciju i potvrdu vrste (ALISPAHIĆ i sur., 2012). Iako je nalaz ove bakterije često opisan u različitim zemljama i načinima uzgoja, ipak se najčešće izdvaja u manjim jatima i onima sa lošim biosigurnosnim mjerama (BOJESEN i sur., 2003 a, b). Zadnjih godina sumnjalo se da je obva bakterija prisutna i na farmama u Hrvatskoj, no nije bilo prijavljenih ili opisanih slučajeva. Ovo istraživanje stoga je omogućilo po prvi puta nalaz proširenosti ove bakterije u RH. Ipak, kako je provedeno samo na 7 farmi, nije moguće opisati pojavnost i proširenost u cijeloj zemlji.

Od ukupno 414 uzoraka različitih organa kokoši nesilica, njih 8% bilo je pozitivno na *G. anatis*. Najveći broj pozitivnih uzoraka bilo je iz obrisaka organa gornjeg dišnog sustava (72%), a samo manji broj iz donjeg (8,6%). Ovaj nalaz podudara se sa nalazom ostalih istraživača koji su također našli veći postotak *G. anatis* u dušniku (28.6%) i ždrijelu (17.8 %) nego u jajovodu (4.2 %) i kloaci (7.5%) (BOJESEN i sur., 2003 a, b). U našem istraživanju, *G. anatis* nije izdvojena iz pluća, koštane srži ili jajnika. Koinfekcija sa *E.coli* dokazana je u 7% uzoraka. Ooforitis i salpingitis nisu nađeni kao patoanatomski nalaz, što je zapravo puno češće kod nalaza *E. coli*. Koinfekcija sa *E.coli* i drugim bakterijama obično otežava kliničku sliku i uzrokuje veće ekonomske gubitke uz veći mortalitet. Mortalitet također ovisi i o virulenciji sojeva *G.anatis*, gdje β-hemolitični sojevi predstavljaju značajniji problem zbog svoje virulencije.

Pojavnost ove bakterija na farmama u Hrvatskoj predstavlja prijetnju za samu proizvodnju, posebno zbog ekonomskih gubitaka. Ukoliko se ove bakterije rano otkriju, moguće je provesti liječenje, no treba biti oprezan zbog čestog i brzog razvoja antimikrobne rezistencije. Primjena cjepiva još uvijek nije u potpunosti zaživjela (JONES i sur., 2013). Pangenomska istraživanja u vakcinologiji omogućuju identifikaciju antigena koji bi bili odgovorni za poticanje zaštitnog imunosnog odgovora. U prvom redu radi se o *Gallibacterium* toksinu GtxA-N i F17 sličnom fimbrijama, koji mogu biti korišteni kao ciljni antigeni jer prvi dolaze u kontakt s organizmom domaćina (BAGER i sur., 2014). Početkom 2018., PERSSON i sur. dokazali su da kombinacija OMV i F1fA (F17 sličan fimbrijama) u cjepivu ima potencijal zaštititi domaćina od razvoja salpingitisa. U tom istraživanju, nisu primijećene pojave upale, eksudata, atrofije folikula i jake hiperemije (PERSSON i sur., 2018). Ipak, istraživanja su još uvijek potrebna kako bi se dokazala učinkovitost te vrijeme poluživota protutijela. Također, trenutno se i autogena cjepiva koriste za zaštitu kokoši nesilica, uglavnom u kombinaciji s *E. coli*, a pokazala su se vrlo djelotvornim u zaštiti kokoši nesilica i smanjivanju mortaliteta i pada nesivosti (GOTTSTEIN i sur., neobjavljeni podatci).

Antimikrobna rezistencija najvjerojatnije je posljedica liječenja drugih bolesti, npr. kolibaciloze. Opisana je rezistencija *G. anatis* na tetracikline, streptomicin, trimetoprim, penicilin, ampicilin, kloramfenikol i norfloksacin (BOJESEN i sur., 2011 a, b; SINGH i sur., 2016; JOHNSON i sur., 2013). Visoka razina biosigurnosnih mjera na farmama i korištenje autogenih cjepiva mogu biti rješenje smanjena pojavnosti i proširenosti ove bakterije, posebno uz sustav "*all in all out"*. Ipak, dodatna istraživanja potrebna su kako bi se istražila patogenost, rezistencija i daljnje mogućnosti cijepljenja.

6. ZAKLJUČCI

- Tijekom istraživanja izdvojene su i identificirane bakterije *G. anatis* na farmama kokoši nesilica u Hrvatskoj, te je tako dokazana njihova prisutnost.
- Prema našim saznanjima, ovo je prvi opis pojave *G. anatis* u Hrvatskoj
- Zbog mogućnosti uzrokovanja velikih gubitaka u peradarstvu, potrebno je razviti učinkovito cjepivo, te primjenjivati mjere biosigurnosti na farmama.
- Daljnja istraživanja potrebna su kako bi se detaljnije identificirale izdvojene bakterije i procijenila epidemiološka situacija u zemlji.

7. LITERATURA

1. ATAEI, S., A. M. BOJESEN., F. AMININAJAFI., M. M. RANJBAR., M. BANANI., M. AFKHAMNIA., A. ABTIN., H. GOODARZI (2016): First isolation from layer chicken in Iran. Archives of Razi Institute 72 (2), 123-128.
2. ALISPAHIC, M., H. CHRISTENSEN, C. HESS, E. RAZZAZI-FAZELI, M. BISGAARD, M. HESS (2012): MALDI-TOF mass spectrometry confirms clonal lineages of *Gallibacterium anatis* between chicken flocks. Vet Microbiol. 160(1-2), 269-73.
3. BAGER R.J., E. KUDIRKIENE, I. PIEDADE, T. SEEMANN, T. K. NIELSEN, S. E: PORS, A. H. MATTSSON, J. D. BOYCE, B. ADLER, A. M. BOJESEN (2014): In silico prediction of *Gallibacterium anatis* pan-immunogens. Vet Res. 45:80. doi: 10.1186/s13567-014-0080-0.
4. BISGAARD, M. (1977): Incidence of *Pasteurella haemolytica* in the respiratory tract of apparently healthy chickens and chickens with infectious bronchitis: characterisation of 213 strains**.** Avian Pathology 6, 285–292.
5. BISGAARD, M. (1982): Isolation and characterization of some previously unreported taxa from poultry with phenotypical characters related to *Actinobacillus* and *Pasteurella* species. Acta Pathol Microbiol Scand B: Microbiol 90, 59-67.
6. BISGAARD, M. (1993): Ecology and significance of *Pasteurellaceae* in animals. Zentralbl Bakteriol 279, 7-26
7. BISGAARD, M., B. M. KORCZAK., H. BUSSE., P. KUHNERT., A. M. BOJESEN., H. CHRISTENSEN (2009): Classification of taxon 2 and taxon 3 complex of Bisgaard with *Gallibacterium*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 59, 735–744.
8. BOJESEN, A. M., S. S. NIELSEN, M. BISGAARD (2003a): Prevalence and transmission of haemolytic *Gallibacterium* species in chicken production system with different biosecurity level. Avian Pathology 32(5), 503-510.
9. BOJESEN, A. M., M. TORPDAHL, H. CHRISTENSEN, J. E. OLSEN., M. BISGAARD (2003b): Genetic diversity of *Gallibacterium anatis* isolates from different chicken flocks. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY 41(6), 2737–2740.

10. BOJESEN, A .M., O. L. NIELSEN., J. P. CHRISTENSEN, M. BISGAARD (2004): In-vivo studies of *Gallibacterium anatis* infection in chicken. Avian Pathology 33(2), 145-152.
11. BOJESEN, A. M, M. E. VAZQUEZ, F. ROBLES, C. GONZALEZ, E. V. SORIANO (2007): Specific identification of by a PCR using primers targeting the 16S rRNA and 23S Rrnagenes. Veterinary Microbiology 123 (1-3), 262-268.
12. BOJESEN, A. M., R. J., BAGER., D. IFRAH., F. M. AARESTRUP (2011a): The rarely reported tetracycline resistance determinant is common in *Gallibacterium anatis*. Veterinary Microbiology 149, 497–499.
13. BOJESEN, A. M., M. E. VAZQUEZ., R.J. BAGER., D. IFRAH., C. GONZALEZ., F.M AARESTRUP (2011b): Antimicrobial susceptibility and tetracycline resistance determinant genotyping of *Gallibacterium Anatis*. Veterinary Microbiology 148, 105–110.
14. CHAVEZ, O. R. F., M. R. M. BARRIOS, H. J. F. CHAVEZ, M. J. ROBLES, I. J. G. A. ESCALANTE, M. ACUÑAYANES (2017): First report of biovar 6 in birds immunized against *Gallibacterium anatis* in poultry farms located in Sonora, Mexico. Veterinaria México OA 4(3), 389.
15. CHRISTENSEN, H., M. BISGAARD, A. M. BOJESEN, R. MUTTERS, J. E. OLSEN (2003): Genetic relationships among avian isolates classified as *Pasteurella haemolytica***,** **"***Actinobacillus salpingitidis***"** or *Pasteurella anatis* with proposal of *Gallibacterium anatis* gen. nov., comb. nov. and description of additional genomospecies within *Gallibacterium* gen. nov. Int J Syst Evol Microbiol 53, 275–287.
16. CHRISTENSEN, B. M., D. FREES, A. M. BOJESEN (2011): Expression and secretion of the RTX-toxin GtxA among members of the genus *Gallibacterium*. Vet Microbiol. 153 (1-2), 116-123. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.05.019. Epub 2011 May 19.
17. HATEM, S., A. B. D. El-HAMID, H. F. ELLAKANY, A. A. BEKHEET, A. R. ELBESTAWY, N. MATARIED (2016): Pathogenicity of Ten *Gallibacterium Anatis* Isolates in Commercial Broiler Chickens. Alexandria Journal of Veterinary Sciences 49 (2), 42-49.
18. JOHNSON, T. S., J. L. DANZEISEN, D. TRAMPEL, L. K. NOLEN, T. SEEMANN, R. J. BAGER, A. M . BOJESEN (2013): Genome Analysis and Phylogenetic Relatedness of *Gallibacterium anatis* Strains from Poultry. PLoS ONE 8(1), e54844.

19. JONES, K. H, J. K. THORNTON, Y. ZHANG, M. J. MAUEL (2013): A 5-year retrospective report of *Gallibacterium anatis* and *Pasteurella multocida* isolates from chickens in Mississippi. Poult Sci 92(12), 3166-71.
20. KOHLERT, R. (1968): Untersuchungen zur Atiologie der Eileiterentzundung beim Huhn. Monatsh Vetmed 23, 392–395.
21. MRAZ, O., P. VLADIK, J. BOHACEK (1976): Actinobacilli in domestic fowl. Zentralbl. Bakteriol (A) 236, 294-307.
22. NEUBAUER, C., M. DE SOUZA-PILZ, A. M. BOJESEN, M. BISGAARD, M. HESS (2009): Tissue distribution of haemolytic *Gallibacterium anatis* isolates in laying birds with reproductive disorders. Avian Pathology 38 (1), 1-7.
23. PAUDEL, S., D. LIEBHART., M. HESS., C. HESS. (2014): Pathogenesis of *Gallibacterium anatis* in a natural infection model fulfils Koch's postulates: 1. Folliculitis and drop in egg production are the predominant effects in specific pathogen free layers. Avian Pathology 43 (5), 443-449.
24. PAUDEL S., C. HESS, P. WERNSDORF, T. KÄSER, S. MEITZ, E. JENSEN-JAROLIM, M. HESS, D. LIEBHART (2015): The systemic multiplication of *Gallibacterium anatis* in experimentally infected chickens is promoted by immunosuppressive drugs which have a less specific effect on the depletion of leukocytes. Vet Immunol Immunopathol. 166 (1-2), 22-32.
25. PERDERSEN, I. J. P., S. E. PORS, R. J. BAGER SKJERNING, S. S. NIELSEN, A. M. BOJESEN (2015): Immunogenic and protective efficacy of recombinant protein GtxA-N against Gallibacterium anatis challenge in chickens. Avian Pathology 44 (5), 386–391.
26. PERSSON, G., S. E. PORS, I. C. N. THOFNER, A. M. BOJESEN (2010): Vaccination with outer membrane vesicles and the fimbrial protein FlfA offers improved protection against lesions following challenge with Gallibacterium anatis. Veterinary Microbiology 217, 104-111
27. PERSSON, G. i A. M. BOJESEN (2015): Bacterial determinants of importance in the virulence of Gallibacterium anatis in poultry. Veterinary Research 46(1), 57. DOI:10.1186/s13567-015-0206-z
28. PERSSON**,** G**.,** S**.** E**.**, PORS**,** I. C. N. THØFNER, A. M. BOJESEN (2018): Vaccination with outer membrane vesicles and the fimbrial protein FlfA offers improved protection

against lesions following challenge with *Gallibacterium anatis*. Vet Microbiol. 217, 104-111.

29. SINGH, S.V., B. R. SINGH, D. K. SINHA, V. KUMAR OR, P. A. ADHANA, M. BHARDWAJ, S. DUBEY (2016): *Gallibacterium anatis*: An Emerging Pathogen of Poultry Birds and Domiciled Birds. J Vet. Sci Techno 7(3), 324.

8. SAŽETAK

Izdvajanje i proširenost bakterije *Gallibacterium anatis* na farmama kokoši nesilica u Hrvatskoj

Gallibacterium anatis čini dio prirodne mikroflore respiratornog i reproduktivnog trakta u peradi, no u određenim uvjetima može uzrokovati bolest. Loši zoohigijenski uvjeti i imunosupresija predisponirajući su čimbenici za pojavu bolesti. Ova bakterija uzrokuje salpingitis, oophoritis, peritonitis te posljedično smanjenu proizvodnju jaja, respiratorne lezije i povišen mortalitet. Ciljevi istraživanja su izolirati i utvrditi učestalost *G.anatis* kod kokoši nesilica u Hrvatskoj. Uzorci iz ždrijela, dušnika, pluća, jajnika, kloake, folikula i koštane srži prikupljeni su na sedam farmi te su uzgajani na 5% ovčjem krvnom agaru na 37 ° C tijekom 24 sata. Čisti izolati su izdvojeni i pohranjeni za daljnu analizu nakon što je fenotipska karakterizacija i genotipska/proteomska identifikacija potvrdila prisustvo *G. anatis*.

U ovom istraživanju uzorkovano je 414 briseva iz različitih organa kokoši iz sedam različitih farmi. Trideset i pet uzoraka bilo je pozitivno na *G. anatis* od kojih su 72% bili iz traheje i ždrijela s najviše pozitivnih uzoraka, dok koštana srž, folikuli i pluća nisu imali pozitivan nalaz. Pokušaji kontrole bakterija antibioticima nisu imali učinka zbog visoke učestalost i rezistencije na više antimikrobnih lijekova, pri čemu je primjena komercijalnih cjepiva također imala nedovoljno zaštitan učinak. No, primjena polivalentnih autogenih cjepiva na bazi lokalnih izolata pokazala se djelotvornom u kombinaciji s drugim vrstama, kao *E. coli*, u zaštiti protiv pada proizvodnju jaja i mortaliteta.

9. SUMMARY

Isolation and prevalence of *Gallibacterium anatis* in layer poultry farms in Croatia

Gallibacterium anatis form part of the natural micro flora of the respiratory and reproductive tract in poultry, given the right condition it can cause disease. Poor zoo hygiene and immunosuppression are predisposing factors for the occurrence of disease. The bacterium is causing salpingitis, oophoritis and peritonitis consequently with decreased eggs production, respiratory lesions and higher mortality. The objectives of the research is to isolate and determine the prevalence of *G.anatis* in layer hens in Croatia. Samples from the pharynx, trachea, lungs, oviducts, cloaca, follicles and bone marrows were collected from seven farms and cultured on 5% sheep blood agar at 37 °C for 24 hours. Pure isolates were isolated and stored where phenotypic characterization and genotypic/proteomic identification confirmed the presence of *G. anatis.*

In this research, 414 swabs from different hen organs from seven different farms were sampled. Thirty five samples were positive to *G. anatis* of which 72% were from the trachea and pharynx, whereas the bone marrow, follicles and lungs had no positive records. The attempts to control the bacterium with antibiotics have poor effect because of multidrug resistance, whereby prevention using commercial vaccines had been of little help. But, application of polyvalent autogenous vaccines based on local isolates proved to be effective in combination with other species, as *E. coli*, in protection against drop in egg production and mortality.

10. CURRICULUM VITAE

Rođen sam 01.04.1984. u Namibiji (regija Zambezi), gdje sam završio osnovnu školu (Lusu Combined School). Nakon toga pohađao sam *Simataa Senior School*. Od 2005. pohađao sam Namibia University of Science and Technology (NUST), gdje sam 2009 stekao diplomu prvostupnika poljoprivrednog menadžmenta. Od 2010. student sam Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.