

# Poredbena analiza titra specifičnih protutijela u serumu i količine bakterije *Mycoplasma synoviae* u obrisku dušnika s ciljem poboljšanja biosigurnosnih mjera na farmama kokoši nesilica lake pasmine

---

Kurevija, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:178:644917>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-08**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -](#)  
[Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET

SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PRIJEDIPLOMSKI I DIPLOMSKI STUDIJ  
*VETERINARSKA MEDICINA*

Lucija Kurevija

Poredbena analiza titra specifičnih protutijela u serumu i količine bakterije  
*Mycoplasma synoviae* u obrisku dušnika s ciljem poboljšanja biosigurnosnih  
mjera na farmama kokoši nesilica lake pasmine

Zagreb, 2024.

# I

Lucija Kurevija

Zavod za bolesti peradi s klinikom

Predstojnik: izv. prof. dr. sc. Željko Gottstein

Zavod za higijenu, dobrobit i ponašanje životinja

Predstojnik: izv. prof. dr. sc. Mario Ostović

Mentori: izv. prof. dr. sc. Željko Gottstein

prof. dr. sc. Kristina Matković

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. doc. dr. sc. Maja Lukač
2. prof. dr. sc. Kristina Matković
3. izv. prof. dr. sc. Željko Gottstein
4. (zamjena) izv. prof. dr. sc. Mario Ostović

Rad sadržava 29 stranica, 11 slika, 1 tablicu i 33 literaturna navoda.

### **Zahvala**

*Zahvaljujem mentoru izv. prof. dr. sc. Željku Gottsteinu na vodstvu i strpljenju pri pisanju diplomskog rada. Hvala Vam što ste uvijek bili na raspolaganju kada mi je bila potrebna pomoć.*

*Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Kristini Matković na vodstvu i savjetima, ne samo pri pisanju diplomskog rada, nego i tijekom svih šest godina studiranja.*

*Veliko hvala mojoj obitelji na neizmjerljivoj podršci i strpljenju, iskrene čestitke. Hvala vam na svakom „Bravo, štreberice!“ nakon svakog položenog ispita, bez iznimke.*

*Hvala mojoj Abbi koja je luda, ali baš zato ju volim.*

*Hvala mojim prijateljima uz koje sam došla od brucoša do veterana uz nebrojene kave i partije pikada. Ispit nije službeno položen dok se ne nazdravi.*

*„I'll be there for you, 'cause you're there for me too.“*

### III

#### Kratice

MS – *Mycoplasma synoviae*

MG – *Mycoplasma gallisepticum*

MM – *Mycoplasma meleagridis*

MI – *Mycoplasma iowae*

PCR – Lančana reakcija polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction*)

ELISA – Imunoenzimni test (engl. *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*)

SPA – Test serumske aglutinacije (engl. *Serum Plate Agglutination Test*)

IHA – Inhibicija hemaglutinacije

## IV

### Popis priloga

Slika 1. Oteklina jastučića stopala i skočnih zglobova u kokoši zaražene s bakterijom *M. synoviae*

Slika 2. Oteklina skočnog zgloba u purana zaraženog s bakterijom *M. synoviae*

Slika 3. Oteklina skočnog zgloba s viskoznom žutim eksudatom u zglobu i oko tetiva u purana zaraženog s bakterijom *M. synoviae*

Slika 4. Deformacije jajne ljuske u kokoši nesilica zaraženih s bakterijom *M. synoviae*

Slika 5. Putovi i izvori širenja infekcije na farmama kokoši nesilica

Slika 6. Prikaz biosigurnosnih upozorenja na ulazu na farmu

Slika 7. Detalji biosigurnosnih upozorenja na ulazu na farmu

Slika 8. „Danish entrance“ model

Slika 9. Shematski prikaz suhog, mokrog čišćenja i dezinfekcije

Slika 10. Korelacija ELISA titra specifičnih protutijela i broja kopija genoma (Spearman  $R=0,61$ ,  $P < 0,0001$ )

Slika 11. Prikaz prosječnog ELISA titra specifičnih protutijela i broja kopija genoma u pojedinim jatima (medijan)

Tablica 1. Rezultati prosječnog ELISA titra specifičnih protutijela u serumu (medijan) i broj MS genoma po qPCR reakciji (medijan) u obriscima traheje.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA .....	2
2.1. Mikoplazmoza peradi .....	2
2.2. Mycoplasma synoviae .....	2
2.2.1. Prijenos .....	2
2.2.2. Problematika više dobnih skupina .....	3
2.2.3. Klinička slika .....	3
2.2.4. Prevencija.....	6
2.2.5. Dijagnostika i monitoring .....	6
2.3. Biosigurnosne mjere .....	8
2.3.1. Lokacija farme i izgradnja peradarskih objekata .....	9
2.3.2. Sprječavanje unošenja i širenja uzročnika preko čovjeka.....	9
2.3.3. Provođenje dezinfekcije, dezinsekcije i deratizacije (DDD) .....	13
2.4. Imunoprofilaksa.....	14
3. MATERIJAL I METODE .....	16
3.1. Provođenje monitoringa .....	16
3.2. Dijagnostika.....	16
3.3. Statistička analiza .....	17
4. REZULTATI .....	18
5. RASPRAVA .....	20
6. ZAKLJUČCI .....	23
7. LITERATURA.....	24
8. SAŽETAK .....	27
9. SUMMARY.....	28
10. ŽIVOTOPIS.....	29

## 1. UVOD

Bakterija *Mycoplasma synoviae* (MS) predstavlja jednu od najčešćih bakterija izdvojenih na farmama kokoši nesilica koja se u jatu prenosi vertikalno ili horizontalno. Infekcija bakterijom MS najčešće se javlja kao subklinička infekcija gornjeg dišnog sustava te može značajno smanjiti kvalitetu jaja i narušiti zdravlje i proizvodnost jata (FERGUSON-NOEL i sur., 2020.). Istraživanje provedeno u Europi i Hrvatskoj pokazuje visoku prevalenciju ove bakterije na farmama kokoši nesilica od preko 80% (HORVATEK TOMIĆ i sur., 2018.; GOTTSTEIN i sur., 2023.). Posebno veliki problem predstavljaju farme s više dobnih skupina (KLEVEN, 2008.), što je čest slučaj upravo kod farmi nesilica konzumnih jaja. S ciljem držanja ove zaraze pod nadzorom, iznimno su važne biosigurnosne mjere te kontinuirana kontrola uzročnika kako bi se pristupilo terapiji u slučaju kliničke manifestacije, ili cijepljenju pilenki u uzgoju. Vrlo vrijednim za monitoring pokazao se dokaz specifičnih protutijela u serumu ELISA testom, kao i primjena molekularnih metoda, poput lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *Real Time PCR*) za dokaz i kvantifikaciju specifičnog odsječka genoma. Budući da je jednom zaraženo jato uvijek zaraženo, cilj ovog istraživanja je utvrditi odnose titra specifičnih protutijela u serumu i kvantifikacije specifičnog odsječka genoma iz obrisaka dušnika iste jedinke u različitim dobnih skupina kokoši nesilica. Procjenom razine imunosti i izlučivanja uzročnika, dobio bi se uvid u opsežnost kontaminacije okoliša, utvrdio način uzorkovanja, s ciljem poboljšanja biosigurnosnih mjera na farmama.



## 2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

### 2.1. Mikoplazmoza peradi

*Mycoplasma spp.* skupina je bakterija iz razreda *Mollicutes* karakterizirane malim genomom, nedostatkom stanične stijenke te specifičnim uvjetima za rast (KLEVEN, 2008.). Više od 20 vrsta mikoplazmi izolirano je iz ptica kao domaćina, od kojih se četiri vrste smatraju patogenima u peradi. *M. gallisepticum* (MG), *M. synoviae* (MS), *M. meleagridis* (MM) i *M. iowae* (MI) mogu uzrokovati značajne probleme na respiratornom sustavu i sinovijalnim membranama, uz smanjenu kvalitetu i proizvodnju jaja, a mogući su uzročnici i smrtnosti zametaka, neuroloških problema te problema s kosturom (FERGUSON-NOEL i sur., 2020.). Vrsta mikoplazme koja još uvijek uzrokuje probleme diljem svijeta, neovisno o stupnju razvoja peradarske proizvodnje, jest MS, često kao podloga za niz sekundarnih bakterijskih zaraza poput npr. kolibaciloze (LANDMAN, 2014.).

### 2.2. *Mycoplasma synoviae*

Bakterija *Mycoplasma synoviae* primarno se javlja u kokoši i purana, ali je infekcija primijećena i u fazana, jarebica, prepelica i patki. Zaraza s MS najčešće se očituje kao subklinička infekcija gornjih dišnih puteva, a potencijalni razvoj i jačanje simptoma ovise i o prisutnosti drugih patogena, kao što su virus newcastleske bolesti, zaraznog bronhitisa, influence itd. (KREIZINGER i sur., 2017.). U takvim uvjetima infekcija može dovesti do upale zračnih vrećica i zaraznog sinovitisa (KLEVEN i FERGUSON-NOEL, 2008.), a uočeni su i pad nesivosti te promjene izgleda i kvalitete ljuske jajeta, uz pad kvalitete jaja (FERGUSON-NOEL i sur., 2020.). Sve navedeno dovodi do narušavanja zdravlja i proizvodnosti jata.

#### 2.2.1. Prijenos

Horizontalno širenje odvija se preko dišnog sustava izravnim i neizravnim putem. Izravni put podrazumijeva direktan kontakt između zaraženih i zdravih jedinki, dok se neizravni odnosi na kontaminaciju hrane, vode i okoliša te putem čovjeka kao posrednika. Dokazano je da MS na perju na sobnoj temperaturi opstaje od 2 do 3 dana te od 10 do 21 dan u suhim uvjetima na 20 °C (MAROIS i sur., 2005.).

Vertikalno ili transovarijalno širenje odnosi se na širenje preko jaja i smatra se najvažnijim za prvobitnu infekciju bakterijom MS (GOTTSTEIN i sur., 2023.).

### 2.2.2. Problematika više dobnih skupina

Zahvaljujući mehanizmima za izbjegavanje imunološkog sustava, kao što je ekspresija specifičnog površinskog glikoproteinskog gena, jednom zaraženo jato ostaje doživotno zaraženo i postaje rezervoar uzročnika (KLEVEN, 2008.).

Iako je vrijeme preživljavanja mikoplazme izvan domaćina kratko, postojanje više dobnih skupina jedinki na istoj farmi omogućuje kontinuirano širenje uzročnika i njegov opstanak na farmi. Ovaj problem je vrlo čest na farmama kokoši nesilica lake linije, na kojima obično postoje minimalno 3 dobne skupine kako bi se osigurala kontinuirana godišnja proizvodnja, koje su u proizvodnji duži period, obično barem godinu dana, a objekti su najčešće međusobno povezani trakama za sakupljanje jaja (DUFOUR-GESBERT i sur., 2006.).

### 2.2.3. Klinička slika

Prvi znakovi zaraze s bakterijom MS su blijedoplavkasta krijesta, usporen rast i hromost, dok neke ptice pokazuju i tendenciju sjedenja. Teže pogođene ptice su mršave, depresivne i može ih se naći kako odmaraju kraj hranilica i pojilica. Mnoge od njih ipak će i dalje jesti i piti ukoliko ih se stavi blizu hrane i vode. Često je prisutna i zelena diskoloracija izmeta s povećanom količinom urata (LOCKABY i sur., 1998.). Skočni zglobovi i stopala su otečeni, iako se otekline mogu javiti i na drugim zglobovima, ili pak u potpunosti izostati (Slike 1 i 2). Patomorfološki u zglobovima i oko tetiva može se naći viskozni eksudat žute do sivkaste boje (Slika 3), zajedno s hepatosplenomegalijom te prošaranim, povećanim i blijedim bubrezima (KLEVEN, 2008.). Kako bolest napreduje, u zglobovima i ovojnica tetiva može se naći kazeozni eksudat koji se potom širi u mišiće i zračne vrećice. Moguća je i pojava sternalnog burzitisa (LOCKABY i sur., 1999.).

Simptomi dišnog sustava jednaki su infekciji s MG, ali blaži, a u sinergiji s drugim patogenima (IB, ART, itd.) razvija se upala zračnih vrećica koja se jače očituje u zimskim mjesecima (KLEVEN i sur., 1972.).

Moguća je pojava pada nesivosti uz promjene kvalitete i izgleda apeksa ljuske jaja u vidu promjene boje i teksture, povećane prozirnosti, deformacija i lakšeg pucanja (FEBERWEE i sur., 2009.) (Slika 4).



Slika 1. Oteklina jastučića stopala i skočnih zglobova u kokoši zaražene s bakterijom *M. synoviae*

(Izvor: <https://www.msdivetmanual.com/poultry/mycoplasmosis/mycoplasma-synoviae-infection-in-poultry>)



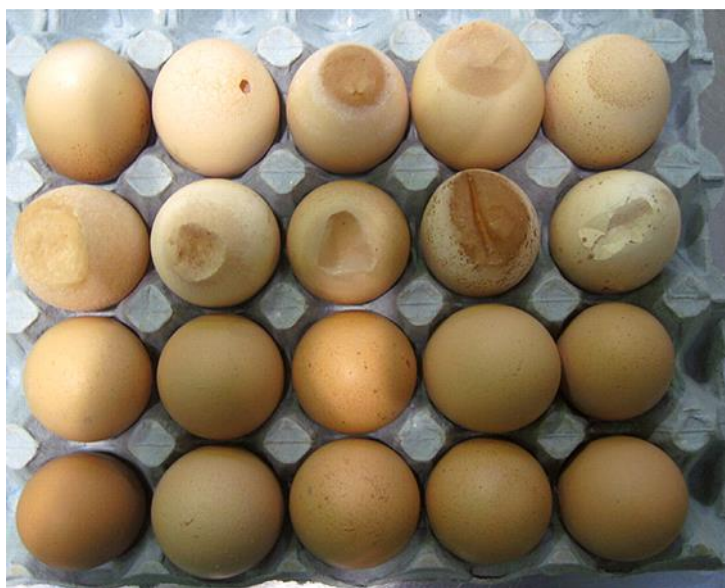
Slika 2. Oteklina skočnog zgloba u purana zaraženog s bakterijom *M. synoviae*

(Izvor: <https://www.msdivetmanual.com/poultry/mycoplasmosis/mycoplasma-synoviae-infection-in-poultry>)



Slika 3. Oteklina skočnog zgloba s viskozim žutim eksudatom u zglobu i oko tetiva u purana zaraženog s bakterijom *M. synoviae*

(Izvor: <https://www.msdivetmanual.com/poultry/mycoplasmosis/mycoplasma-synoviae-infection-in-poultry>)



Slika 4. Deformacije jajne ljuske u kokoši nesilica zaraženih s bakterijom *M. synoviae*

(Izvor: <https://www.nadis.org.uk/disease-a-z/poultry/diseases-of-farmyard-poultry/part-1-mycoplasmosis/>)

#### 2.2.4. Prevencija

Kontrola i sprečavanje širenja mikoplazmoze u peradi uključuju nekoliko bitnih čimbenika: biosigurnosne mjere, dijagnostiku, liječenje i cijepljenje (KLEVEN, 2008.).

Biosigurnosne mjere imaju važnu ulogu i njihovo strogo provođenje je nužno na svim farmama kokoši nesilica (KLEVEN, 2008.). Kako bi mogli potvrditi učinkovitost provedenih biosigurnosnih mjera koristimo dijagnostičke postupke, u slučaju zaraze s MS najčešće koristimo ELISA ili qPCR metodu.

Liječenje može biti vrlo korisno u sprječavanju kliničkih znakova i ekonomskih gubitaka, ali ne može u potpunosti eliminirati infekciju u jatu pa se ne smatra zadovoljavajućim dugotrajnim rješenjem (KLEVEN, 2008.).

Na farmama na kojima održavanje jata slobodnim od infekcije nije moguće, cijepljenje se pokazalo kao najbolja opcija kontrole zaraze. Najboljim izborom u tu svrhu pokazalo se živo atenuirano MS-H cjepivo (KLEVEN, 2008.).

#### 2.2.5. Dijagnostika i monitoring

Dijagnoza zaraze bakterijom MS zasniva se na dokazivanju specifičnih protutijela i/ili patogena. Specifična MS protutijela dokazuju se provođenjem seroloških metoda u koje ubrajamo serumsku aglutinaciju (SPA), inhibiciju hemaglutinacije (IHA) i imunoenzimski test (ELISA) (EWING i sur., 1996.), dok se za dokaz MS patogena provode uzgoj u kulturi ili određivanje postojanja specifičnih nukleinskih kiselina PCR metodom.

##### a) Serološke metode

Serološki testovi koji se najčešće koriste u dijagnostici zaraze s MS su SPA, IHA i ELISA (OIE, 2018.).

SPA test je brz, jednostavan i jeftin, a MS antigeni su komercijalno dostupni. Izvodi se miješanjem uzorka seruma i MS antigena u jednakim količinama, dok se u MS antigen dodaje boja u svrhu poboljšanja vidljivosti reakcije. Dobra osjetljivost SPA testa temelji se na dokazu IgM protutijela, proizvedenih u ranoj fazi infekcije, dok se glavnim nedostatkom smatra niska specifičnost ovog testa.

IHA test pokazuje veću specifičnost, ali i nižu osjetljivost u odnosu na SPA test. Njegovom se primjenom dokazuju IgY protutijela, nastala u kasnijoj fazi infekcije, što znači da su za

njihovu detekciju potrebna barem tri tjedna. IHA se najčešće provodi kako bi se potvrdili pozitivni rezultati (KABOUDI i JBENYENI, 2019.).

S ciljem poboljšanja specifičnosti SPA testa i osjetljivosti IHA testa, razvijena je ELISA, kojom se dokazuju sva stvorena specifična protutijela (HIGGINS i WHITHEAR, 1986.; OPTIZ, 1983.).

S obzirom na činjenicu da su pri primjeni seroloških testova moguće unakrižne reakcije MS s drugim vrstama mikoplazmi i posljedično tome lažno pozitivni rezultati, ove se metode uglavnom koriste za postavljanje preliminarnе dijagnoze i provođenje monitoringa, dok je definitivnu dijagnozu potrebno ustanoviti izolacijom i identifikacijom uzročnika, ili molekularnim metodama (KABOUDI i JBENYENI, 2019.).

#### b) Uzgoj i identifikacija

Iako se uzgoj i identifikacija uzročnika smatraju valjanom metodom potvrde konačne dijagnoze, proces je dugotrajan. Na pojavu prvih kolonija može se čekati čak i do 4 tjedna, a može doći i do prerastanja s drugim vrstama mikoplazmi, što ovu metodu čini nepraktičnom za svakodnevnu primjenu u postavljanju dijagnoze MS (FERGUSON-NOEL i WILLIAMS, 2015.).

#### c) Molekularne metode

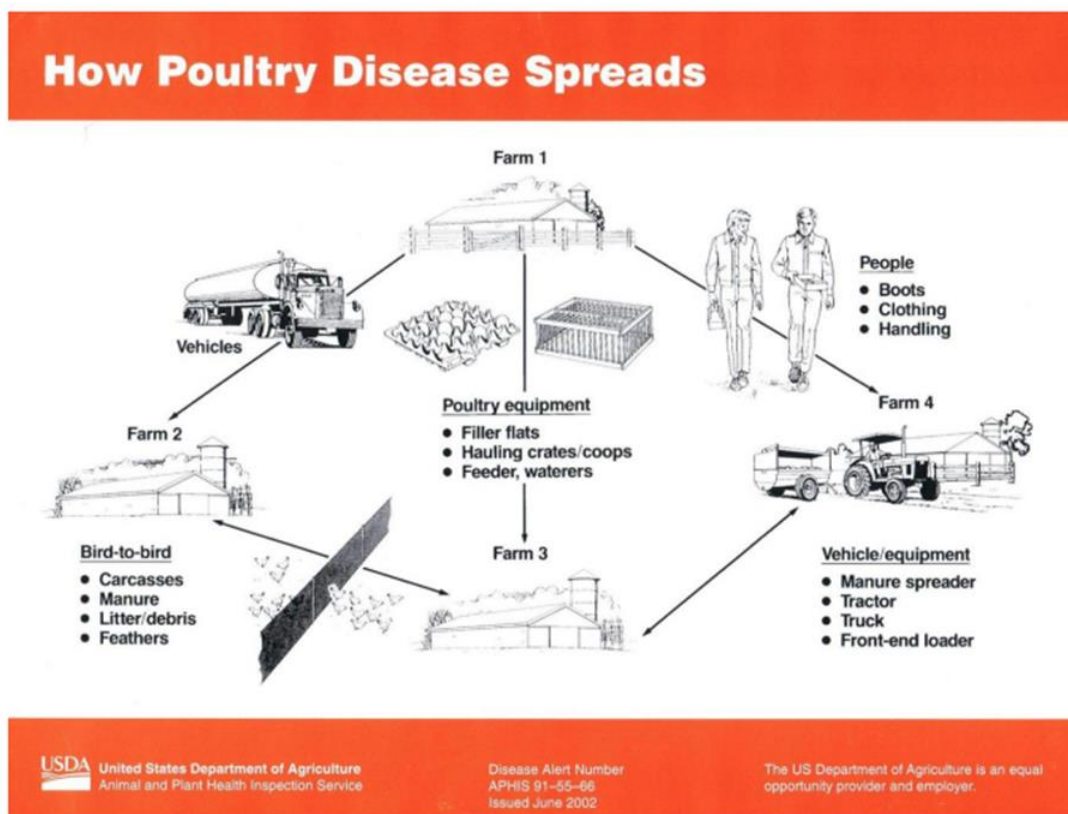
Zbog nedostataka prethodno navedenih metoda, primjena molekularnih metoda predstavlja značajan napredak u dijagnostici zaraze bakterijom MS.

Lančana reakcija polimeraze (PCR) brža je, preciznija i sigurnija metoda, koju karakteriziraju visoka specifičnost i osjetljivost, zbog čega predstavlja alternativu prethodno korištenim metodama. Posebno vrijednom metodom pokazala se lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *Real Time PCR*) za dokaz i kvantifikaciju specifičnog odsječka genoma u analiziranom uzorku. Prednost primjene PCR metode je i mogućnost dokaza postojanja koinfekcija s drugim vrstama mikoplazmi i drugim uzročnicima dišnih bolesti peradi (IB, ptičji metapneumovirus) (KABOUDI i JBENYENI, 2019.).

### 2.3. Biosigurnosne mjere

Intenzivna peradarska proizvodnja podrazumijeva smještaj velikog broja životinja na malom prostoru, čime se ostvaruje predispozicija za razvoj rizika od različitih oboljenja koja se relativno brzo šire jatom i na taj način prijete ne samo narušavanju dobrobiti životinja, nego i održivosti proizvodnje (MATKOVIĆ i sur., 2013.). U svrhu očuvanja zdravlja i proizvodne sposobnosti životinja te održavanja kvalitete proizvoda životinjskog podrijetla, obavezno je provođenje biosigurnosnih mjera na farmama kokoši nesilica i u pakirnom centru za jaja.

Biosigurnosne mjere podrazumijevaju postupke čijom se provedbom smanjuje rizik od uvođenja i širenja uzročnika bolesti. Uključuju održavanje čistoće, smanjenje mikrobne kontaminacije i nadzor insekata, glodavaca, ptica i drugih životinja koje mogu biti posrednici zaraznih bolesti. Vrlo je važan i nadzor kontrole kretanja zaposlenika, vozila i posjetitelja te prikladno zbrinjavanje nusproizvoda životinjskog podrijetla (Slika 5).



Slika 5. Putovi i izvori širenja infekcije na farmama kokoši nesilica

(Izvor: <https://www.inpoultry.com/module-4-basic-biosecurity-for-your-flock>)

### 2.3.1. Lokacija farme i izgradnja peradarskih objekata

Pri odabiru lokacije za izgradnju peradarske farme trebala bi obratiti pažnja na nekoliko stavki. Prostor farme trebao bi biti izoliran od naseljenog područja i barem 3 kilometra udaljen od drugih peradarskih farmi, ili farmi drugih vrsta životinja. Preporučuje se primjena iste udaljenosti i od većih prometnica koje bi mogle služiti prijevozu peradi.

Područje farme mora biti jasno ograđeno kako bi se mogao kontrolirati ulazak i izlazak zaposlenika, vozila i posjetitelja s farme. Vegetacija oko farme mora biti minimalna i uredno održavana.

Prilazni putovi i putovi unutar farme moraju biti dovoljno široki i od čvrstog materijala, što uključuje i šljunak, a površina ispred svakog objekta trebala bi biti betonirana ili asfaltirana. Te karakteristike ne samo da olakšavaju kretanje vozila, nego čine putove pogodnima za čišćenje i pranje (AVIAGEN, 2018.).

Zidne površine objekta trebaju biti prekriveni materijalom koji nije štetan po zdravlje životinja, a pogodan je za jednostavno čišćenje, pranje i dezinfekciju. Pod treba biti betonski, također u svrhu lakšeg čišćenja i održavanja (AVIAGEN, 2018.).

### 2.3.2. Sprječavanje unošenja i širenja uzročnika preko čovjeka

Ulaz na farmu mora se strogo kontrolirati i ograničiti na zaposlenike, dok se o svim posjetiteljima mora voditi evidencija s datumom ulaska i izlaska te razlogom posjeta. Na ulasku na farmu mora biti postavljena dezbarijera za vozila i ljude, kao i na ulasku u svaki objekt. Prije uranjanja obuće u dezbarijeru potrebno je s nje ukloniti organski materijal (PRUKNER RADOVČIĆ i sur., 2017.). Mora se osigurati i osoba koja će biti zadužena za održavanje dezbarijera, što uključuje njihovo redovito pražnjenje i čišćenje.

U najčešće korištene dezinficijense ubrajaju se:

- Kvarterni amonijevi spojevi
- Proizvodi na bazi klora
- Jodofori, fenoli, formaldehid (plinjenje) (MATKOVIĆ i MATKOVIĆ, 2006.)

Primjer izrade radne otopine koja se koristi za izradu dezbarijere na ulazu u farmu ili objekte:

1. Ecocid/Virkon : U kanistar s 10 litara vode stavimo 100 grama sredstva i promućkamo. Treba paziti da Ecocid/ Virkon u prahu uvijek bude uz svaku dezbarijeru u zatvorenoj i



označenoj posudi jer inače gubi učinkovitost. Uz dezbarijeru uvijek mora biti i kanistar od minimalno 10 litara aktivne radne otopine.

2. Virocid (koncentrirani dezinficijens na bazi kvarternih amonijevih spojeva):

Kanistar od 5 litara + 50 ml sredstva

Kanistar od 10 litara + 100 ml sredstva

Kanistar od 20 litara + 200 ml sredstva

3. Kickstart (peroksidni dezinficijens):

Kanistar od 10 litara + 100 ml sredstva

Kanistar od 20 litara + 200 ml sredstva

4. Viroguard (tekući dezinficijens baziran na osnovi glutaraldehida i kationskog tenzida): koristi se samo za dezinfekciju na ulazu kao koncentrat koji pumpa sama dozira

Izmjena svake ulazne dezbarijere provodi se minimalno svaki dan (farma, štale, sortirnica), osim ako nije propisano i češće.

Posjetitelje se mora upoznati s mjerama biosigurnosti te na farmu mogu ući tek nakon što su obavili dezinfekciju, a kretanje im je dozvoljeno tek nakon oblačenja zaštitne odjeće i obuće koja podrazumijeva jednokratna zaštitna odijela, mrežice za kosu i nazuvke. Kretanje je dopušteno samo uz ovlaštenu osobu. Upozorenja vezana za biosigurnost nalaze se na samom ulazu na farmu (Slike 6 i 7).



Slika 6. Prikaz biosigurnosnih upozorenja na ulazu na farmu (Foto: D. Vidas)

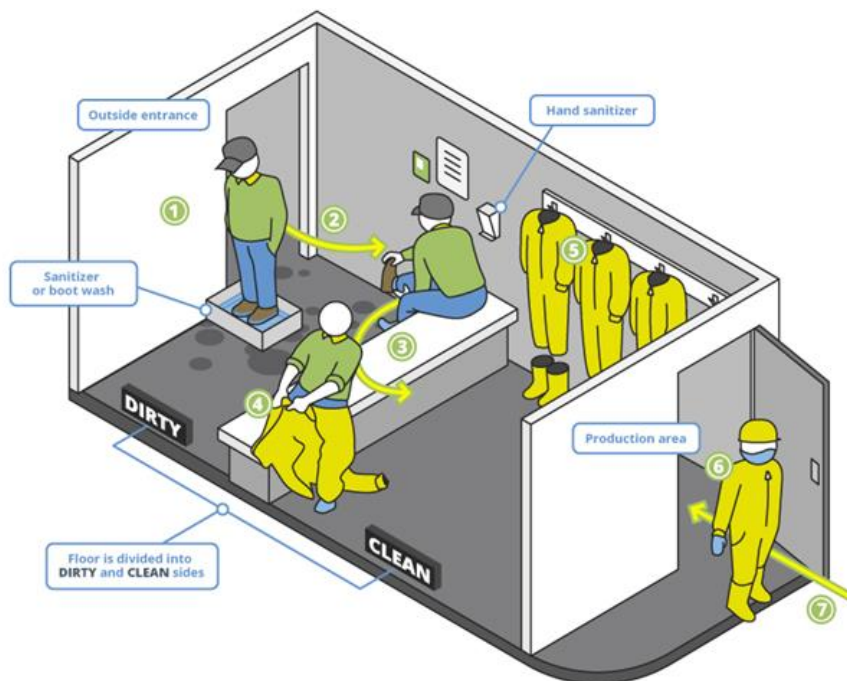


Slika 7. Detalji biosigurnosnih upozorenja na ulazu na farmu (Foto: D. Vidas)

Potrebna je organizacija kretanja zaposlenika na farmi s ciljem minimalizacije nepotrebnog i nekontroliranog kretanja unutar farme. Također, na farmama s više dobnih skupina, bitno je paziti na pravilan redoslijed kretanja. Prvo se ulazi u objekte s najmlađom perad, a na kraju u objekte u kojima je smještena perad pod sumnjom na određenu bolest, ili ona kod koje je bolest već potvrđena (PRUKNER RADOVČIĆ i sur., 2017.).

Svi zaposlenici prije ulaska na farmu moraju dezinficirati ruke i obuću. Potrebno je osigurati posebnu odjeću i obuću za rad sa životinjama u objektima, dok je njeno iznošenje i izlazak s farme zabranjen. Za presvlačenje u istu odjeću mora postojati garderoba u kojoj se odvajaju čista i nečista odjeća, a po potrebi se osigurava i prostor za tuširanje (VUČEMILO, 2008.).

Ruke je potrebno prati i dezinficirati prije ulaska te nakon izlaska iz svakog objekta. Pri ulasku u objekt treba nastojati minimalizirati unos vanjskih patogena, zbog čega je korisno prostor razdijeliti na čisti i nečisti. U tu se svrhu, prije kontakta s peradi, provodi „Danish entrance“ model (Slika 8). Pri ulasku u nečisti prostor čizme se uranjaju u dezbarijeru, nakon čega se skidaju, zajedno s nečistom odjećom. Ruke se dezinficiraju i prelazi se na klupu koja predstavlja liniju razdvajanja između dva prostora. Oblači se čista odjeća i obuća, nakon čega se ulazi u objekt sa životinjama (JANNI, 2017.).



Slika 8. „Danish entrance“ model

(Izvor: <https://ew-nutrition.com/tag/poultry/?print=print-search>)

Zaposlenici ne smiju u svom domaćinstvu držati domaću perad ili ukrasne ptice, niti smiju raditi u bilo kakvoj drugoj peradarskoj proizvodnji.

### 2.3.3. Provođenje dezinfekcije, dezinfekcije i deratizacije (DDD)

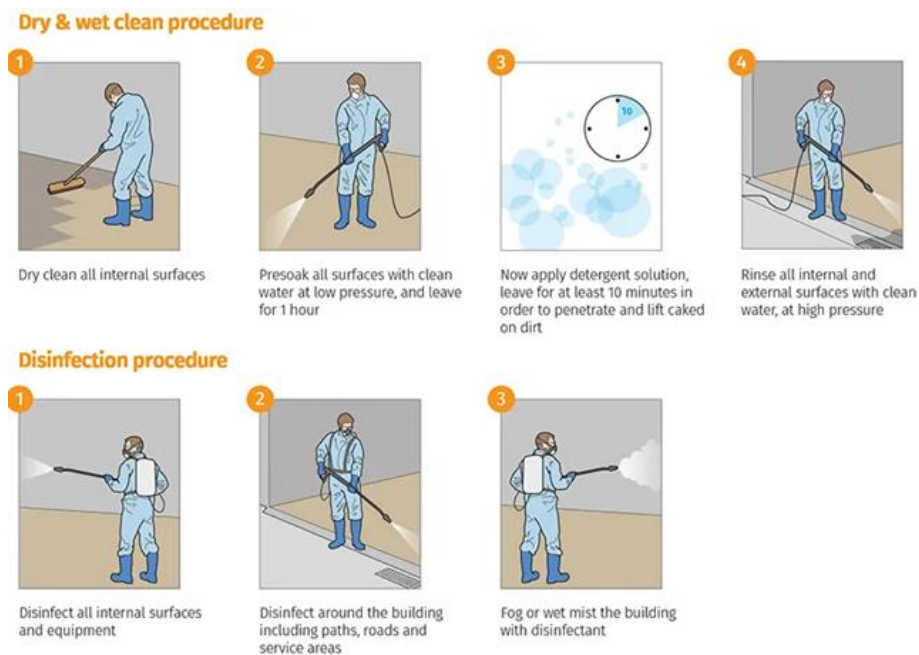
Intenzivna peradarska proizvodnja zahtijeva provođenje profilaktičke dezinfekcije nakon svakog proizvodnog ciklusa te za vrijeme odmora objekta. Prije same dezinfekcije, obavezno je pristupiti temeljitom čišćenju jer, osim što se njime uklanja znatan broj mikroorganizama, postojanje veće količine organske tvari može znatno smanjiti učinkovitost dezinficijensa, ovisno o vrsti korištenog dezinficijensa (MATKOVIĆ i MATKOVIĆ, 2006.).

Prvo se pristupa suhom čišćenju, kojim se fizički uklanja sav materijal, poput gnoja, stelje, perja, i to metenjem, izgnojavanjem i ispuhivanjem. Nakon toga, pristupa se mokrom čišćenju, što uključuje pranje površina i opreme vodom i deterdžentima ribanjem, četkanjem i visokotlačnim parnim uređajima (VUČEMILO, 2008.). Deterdžente se mora temeljito isprati, a sve površine moraju biti čiste i suhe prije početka dezinfekcije (Slika 9).

Standardni operativni postupak dezinfekcije objekata na farmi je sljedeći:

- Objekt se prije dezinfekcije mora osušiti, a svi ulazi i izlazi zraka moraju se zaštititi.
- Dezinficira se pomoću termalnog zamagljivača (ULV) u koji se stavi radna otopina odabranog dezinficijensa.
- Radna otopina: na svakih 1000 m<sup>3</sup> prostora u objektu koristi se, primjerice, 1 litra Virocida, 1 litra propylen glycola i 3 litre vode.

Potrebno je voditi evidenciju svakog objekta u koju se upisuje datum podmazivanja opreme, čišćenja i dezinfekcije.



Slika 9. Shematski prikaz suhog, mokrog čišćenja i dezinfekcije

(Izvor: <https://www.asian-agribiz.com/2020/08/28/improving-biosecurity-to-reduce-disease-challenges-in-poultry-farms/>)

Minimalni odmor objekata između proizvodnih ciklusa mora iznositi 14 dana. Na farmama s više dobnih skupina nesilica nužno je primjenjivati načelo „all in-all out“ jer na taj način osiguravamo prekid lanca infekcije i smanjujemo mikrobiološku kontaminaciju na farmi (PRUKNER RADOVČIĆ i sur., 2017.).

## 2.4. Imunoprofilaksa

Učinkovitom metodom prevencije MS na višedobnim farmama kokoši nesilica pokazalo se cijepljenje. Iako u Republici Hrvatskoj ono nije zakonski propisano, na nekim se farmama provodi kako bi smanjili pojavu i širenje uzročnika, za što se koristi živo i temperaturno osjetljivo MS-H cjepivo.

Izvorni MS terenski izolat atenuiran je kemijskom mutacijom i uzgajan na temperaturi od 33 °C te odabran kao temperaturno osjetljiv t+ fenotip. Temperaturno osjetljivi klon odabran za razvoj cjepiva identificiran je kao soj MS-H (MORROW i sur., 1998.). Zbog temperaturne osjetljivosti MS-H soj se ne može širiti vertikalno te je pogodan za cijepljenje rasplodnih jata.

Primarno djelovanje MS-H cjepiva zasniva se na kolonizaciji sluznice gornjeg dišnog sustava, čime se stimulira lokalna imunost, a istovremeno se zauzimaju mjesta vezanja divljeg soja. Navedeno cjepivo ima sposobnost postupnog istiskivanja divljeg soja s farme.

Dokazano je kako je MS-H cjepivo apatogeno i ne uzrokuje lezije gornjeg dišnog sustava ni sinovijalnih šupljina, a također izostaju klinički znakovi (MARKHAM i sur., 1998.a).

Cjepivo se primjenjuje okulonazalno, a može se dodati i plava boja kako bi se provjerila točnost aplikacije.

Jednokratna primjena cjepiva osigurava doživotnu mukoznu stimulaciju, a preporuča se u dobi između 3 i 6 tjedana. Cijepljene jedinice ne bi trebale biti izložene području inficiranom s MS barem tri tjedna nakon cijepljenja. Dokazano je i da je MS-H cjepivo sigurno za istovremenu aplikaciju s cjepivima protiv drugih dišnih bolesti peradi, kao što su MG i zarazni bronhitis (IB) (MARKHAM i sur., 1998.b).

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Provođenje monitoringa

Monitoring bakterije MS proveden je na 9 jata na 4 farme kokoši nesilica u periodu od jedne godine s ciljem kontrole prisutnosti MS koristeći dvije metode dijagnostike. Biosigurnosne mjere provode se po prethodno opisanom postupku i svi djelatnici strogo i kontrolirano ih se pridržavaju.

#### 3.2. Dijagnostika

Dokaz prisutnosti bakterije MS u jatu kokoši nesilica lake linije proveden je na dva načina. S ciljem uobičajene kontrole razine imunosti ELISA testom nakon prethodno provedene imunoprofilakse dostavljeno je po 10 seruma po jatu. U svrhu dokaza razine titra specifičnih protutijela za bakteriju MS korišten je komercijalni ELISA kit MS ELISA (BioChek, Reeuwijk, Nizozemska) prema uputi proizvođača. Optička gustoća je očitana pri 405 nm na spektrofotometru  $\mu$ Quant (Bio-Tek Instruments, SAD) te preračunata sukladno uputama. Od istih jedinki u isto vrijeme uzet je i obrisak dušnika. Obrisci su po zaprimanju do daljnjeg postupka čuvani na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Iz obrisaka je izdvojena ukupna DNA primjenom komercijalnog GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, Co., St Louis, MO, SAD), prema uputi proizvođača, te je po izdvajanju provjerena koncentracija i čistoća izdvojene DNA primjenom uređaja BioDrop (Cambridge, UK). U izdvojenoj DNA postupkom qPCR-a dokazano je i kvantificirano prisustvo specifičnih odsječaka 16S–23S rDNA ISR regije genoma bakterije MS na uređaju Mx3005P (Stratagene, La Jolla, CA, SAD) primjenom specifičnih početnica i TaqMan probe umnažajući 16S–23S ISR regiju (F- ctaaataacaatagcccaaggcaa, R- cctcctttcttacggagtaca i proba- 5'FAM- agcgatacacaaccgcttttagaat-BHK1-3') (RAVIV i KLEVEN, 2009). Za qPCR reakciju je korišten kit 2x GoTaq® Probe qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, SAD) u ukupnom volumenu od 20  $\mu\text{L}$  uz 5  $\mu\text{L}$  DNA. S ciljem kvantifikacije specifičnih odsječaka u istoj reakciji su analizirani uzorci poznate koncentracije u triplicatu u tri različita deseterostruka razrijeđenja. Dobivene Ct vrijednosti pri qPCR reakciji su analizirane pripadajućim računalnim programom MxPro qPCR Software (Stratagene, La Jolla, CA, SAD).

### **3.3. Statistička analiza**

Rezultati dobiveni analizama prvotno su testirani Kolmogorov-Smirnovljevim testom kako bi se utvrdila normalnost raspodjele dobivenih vrijednosti. Vrijednosti ELISA titra u serumu i broja kopija genoma bakterije MS testirane su Kruskal-Wallisovom analizom varijance i sumom rangova, a razina korelacije između ELISA titra i broje kopija genoma testirana je Spearmanovim testom, primjenom računalnog programa Statistica 13 (Tibco, SAD). Vrijednosti su prikazane kao medijan, a testirane su na razini značajnosti  $p \leq 0,05$ .



#### 4. REZULTATI

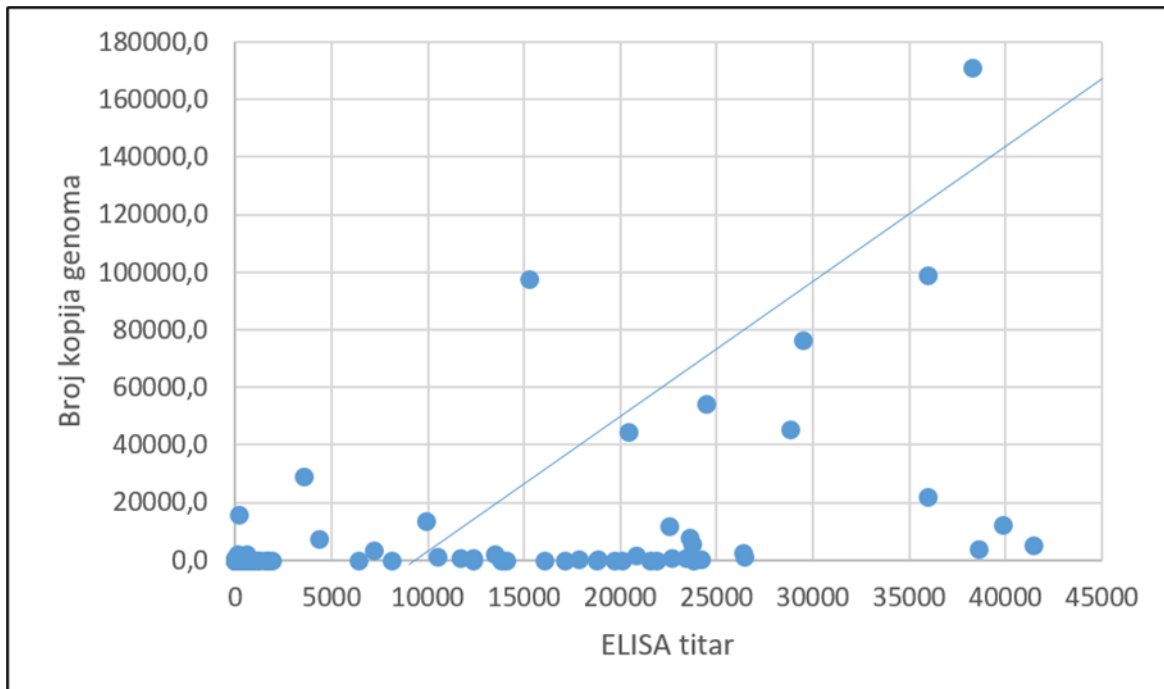
Rezultati pretrage na titar specifičnih protutijela i broj genoma MS prikazani su u Tablici 1. te Slikama 10 i 11.

Odnos titra specifičnih protutijela i broja kopija genoma analizom svih jata međusobno pokazuje visoku razinu korelacije ( $R=0,61$ ,  $P < 0,0001$ ) (Slika 10), što ukazuje da u prosjeku visoki titar protutijela, znači i visok broj genoma, odnosno mikoplazmi u dušniku.

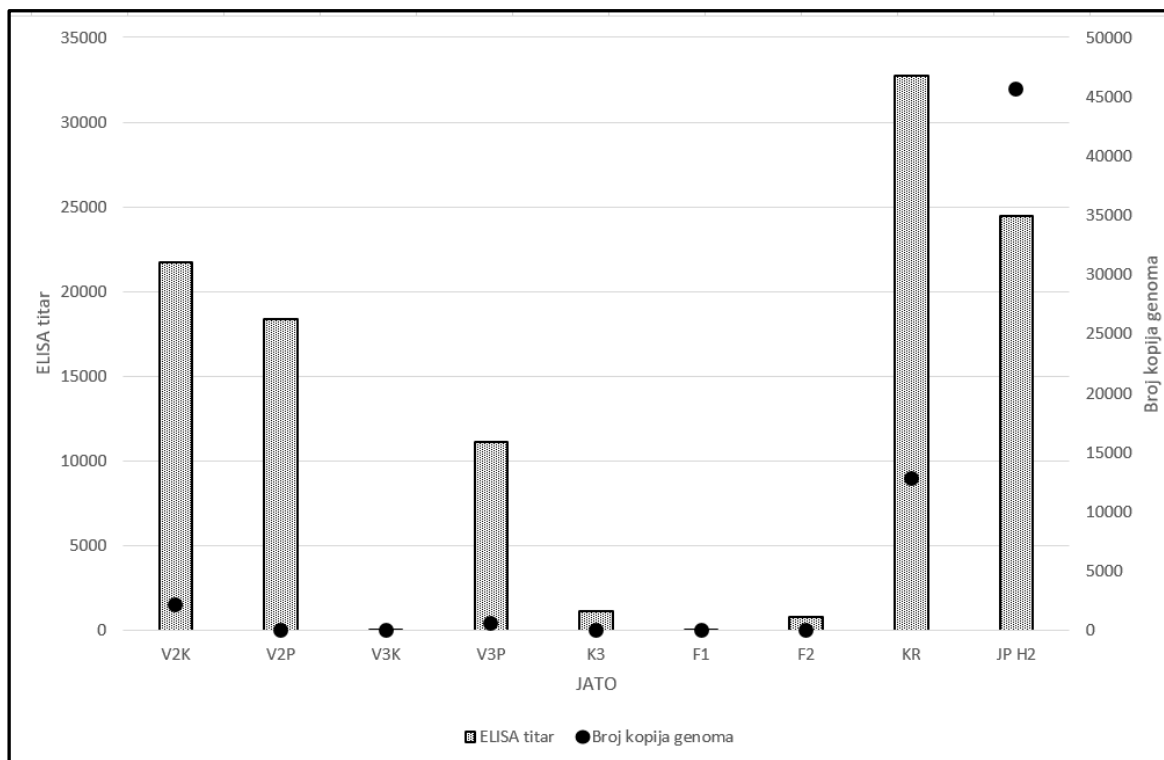
No, analiza korelacije po jatima (Slika 11) pokazuje da jedino jato JP ima statistički značajnu korelaciju, ali je vidljivo da jata s nižim titrom protutijela imaju i niži broj kopija genoma. Izuzetak je jato V2P, kod kojeg usprkos visokom titru protutijela nema prisutnih bakterija u obrisku dušnika.

Tablica 1. Rezultati prosječnog ELISA titra specifičnih protutijela u serumu (medijan) i broj MS genoma po qPCR reakciji (medijan) u obriscima traheje.

FARMA	JATO	DOB (tjedni)	ELISA titar	Broj kopija genoma
1	V2K	70	21695	2134
	V2P	70	18382	0
	V3K	21	14	0
	V3P	21	11105	606
	K3	19	1160	0
2	F1	42	16	0
	F2	48	771	4
3	KR	75	32710	12810
4	JP H2	80	24456	45679



Slika 10. Korelacija ELISA titra specifičnih protutijela i broja kopija genoma (Spearman  $R=0,61$ ,  $P < 0,0001$ )



Slika 11. Prikaz prosječnog ELISA titra specifičnih protutijela i broja kopija genoma u pojedinim jatima (medijan).

## 5. RASPRAVA

Bakterija *Mycoplasma synoviae* u intenzivnoj peradarskoj proizvodnji može uzrokovati probleme na respiratornom sustavu i sinovijalnim membranama, a najčešće se očituje kao subklinička infekcija gornjeg dišnog sustava. U kokoši nesilica lake linije najveći problem predstavlja pojava pada nesivosti te abnormalnosti apeksa jajne ljuske koje znatno smanjuju kvalitetu jaja i proizvodnost jata, posljedično uzrokujući potencijalno velike ekonomske gubitke.

Jednom zaraženo jato s MS je uvijek zaraženo, pri čemu zaraza najčešće prolazi asimptomatski (KLEVEN i FERGUSON-NOEL, 2008). No, zaraza s MS često predstavlja podlogu za razvoj drugih zaraza, poput kolibaciloze (RAVIV i sur., 2007.), što značajno povećava gubitke nastale nakon zaraze. Upravo iz navedenog razloga iznimno je bitan monitoring jata kako bi se utvrdilo prisustvo uzročnika u jatima te potreba i mogućnost njegove kontrole (LANDMAN, 2014.). Rezultati provedenih monitoringa u Europi i Hrvatskoj pokazuju da je prevalencija MS na farmama kokoši nesilica lake linije vrlo visoka, i preko 90 % (GOTTSTEIN i sur, 2023.), što pokazuje na njezinu prisutnost i zadržavanje na farmama. Mikoplazme vrlo kratko mogu preživjeti izvan domaćina, no problem predstavljaju farme s više dobnih skupina, najčešće tri, koje su u proizvodnji duži period, što je na farmama nesilica uobičajena praksa. Navedeno omogućuje kontinuirano zadržavanje uzročnika na farmi i širenje među jatima (KLEVEN i FERGUSON-NOEL, 2008.). Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi prevalenciju MS na farmama kokoši nesilica koristeći dva najčešća dijagnostička postupka, ELISA dokaz titra specifičnih protutijela u serumu i dokaz uz kvantifikacije specifičnog odsječka genoma iz obrisaka dušnika iste jedinice u različitim dobnih skupina kokoši nesilica. Primjena ELISA postupka najčešći je oblik serološke dijagnostike koja ukazuje na imunski odgovor domaćina te da je uzročnik već neko vrijeme prisutan u jatu, jer je za razvoj titra potrebno nekoliko tjedana (KUO i sur., 2017.). No, postoje i lažno pozitivni rezultati, najčešće kao posljedica zaraze nekom srodnom vrstom. Procjenom prevalencije i izlučivanja uzročnika, može se dobiti uvid u opsežnost kontaminacije okoliša, a s ciljem procjene epizootiološkog stanja i poboljšanja biosigurnosnih mjera na farmama.

S obzirom da se radi o permanentnoj zarazi, očekuje se prisustvo visoke razine specifičnog titara protutijela u serumu, kao i prisustvo visokog broja kopija genoma u obrisku dušnika, što je i potvrđeno analizom svih jata međusobno. Analiza korelacije titra protutijela i broja kopija genoma u obrisku dušnika ima statistički značajnu pozitivnu razinu korelacije

( $p < 0,0001$ ), što upućuje na blisku vezu odnosa titra protutijela i broja genoma u dušniku, što je i za očekivati.

Promatra li se analiza korelacije po jatima, utvrđeno je da jedino jato JP ima statistički značajnu pozitivnu korelaciju, uz visok titar protutijela i visoki broj kopija genoma. Kod drugih jata se može uočiti da je uz niži titar protutijela prisutan i niži broj kopija genoma, ali nije statistički značajno. Odstupanje je zabilježeno kod jata V2P (Slika 11), koje pokazuje da usprkos visokom titru protutijela nisu dokazane bakterije u obrisku dušnika. Jedan od mogućih uzroka ovakvih rezultata moguće može biti uzorkovanje. Istraživanja su pokazala da je suhi obrisak dušnika najbolji uzorak za dokaz mikoplazmi qPCR postupkom (FERGUSON-NOEL i sur., 2012.), pri čemu duže čuvanje na nepovoljnoj temperaturi može dovesti do pada broja kopija genoma. Idealno je odmah po uzorkovanju uzeti uzorak čuvati na hladnom te po dolasku u laboratorij odmah izdvojiti DNA. No, pri uzimanju obriska dušnika, može doći do pogreške pri kojoj obrisak, umjesto dušnika, klizne u ždrijelo, čime se na sluznici ždrijela zahvati manji broj bakterija. Mogući problem može nastupiti i pri izdvajanju DNA, no s obzirom da su svi uzorci obrađivani paralelno, a druga jata ne pokazuju ovako značajnu razliku, problem pri izdvajanju DNA u laboratoriju se može isključiti (FERGUSON-NOEL i sur., 2012.).

Jata koja pokazuju nizak titar protutijela i nizak broj kopija genoma najčešće su mlada jata, kod kojih je zaraza u ranom fazi, a nastupa uslijed zaražavanja po dolasku na proizvodnu farmu, budući su uzgoji najčešće slobodni od MS. Jato F2 je jato koje je nakon mjesec dana od prve kontrole pokazalo veći broj kopija u dušniku, uz nizak titar, što govori o mogućoj ranoj zarazi.

Jednom kada dođe do infekcije s bakterijom MS, teško ju je iskorijeniti. Upravo zbog toga, potrebno je spriječiti ulazak uzročnika na farmu, što se postiže pravilnim provođenjem biosigurnosnih mjera. Dobro uspostavljena kontrola na farmama spriječit će ulazak i širenje uzročnika među jatima. Preporuča se obvezno tuširanje prije ulaska na farmu, uz korištenje jednokratne ili odjeće i obuće samo za pojedini objekt/jato, uz obveznu dezinfekciju ruku pri ulasku.

Provedbom monitoringa i dobivanjem rezultata prevalencije dobivamo uvid u zaraženost jata što nam je polazna osnova za pripremu daljnjih postupaka na farmi i smanjenja očekivanih gubitaka uslijed drugih zaraza ili loše kvalitete ljuske jaja (LANDMAN, 2014.). U slučaju da je farma MS pozitivna moguće je zarazu ukloniti depopulacijom svih jata, što je često korištena mjera u rasplodnim jatima. Nakon uklanjanja izvora, čišćenja, dezinfekcije i odmora svih objekata mikoplazme se ne mogu prenijeti na drugo jato. Potom kontrolu zaraze moguće je provesti terapijom, što je često korištena mjera u rasplodnim jatima, no rjeđe korištena mjera

u proizvodnji konzumnih jaja zbog karence antimikrobnih pripravaka i česte pojave i širenja rezistencije u drugih mikroorganizama. Danas je najčešći oblik kontrole MS na farmama cijepljenje primjenom termo osjetljivog MS-H soja (MARKHAM i sur., 1998. b,c). Ovo cjepivo osigurava trajnu zarazu gornjih dišnih prohoda te sprječava ulazak i pasažu divljih sojeva uz poticanje lokalne imunosti i nizak serumski titar specifičnih protutijela. Uslijed navedenog cjepivo se ne širi vertikalno te omogućava postupno istiskivanje divljih sojeva s farme (MARKHAM i sur., 1998.b).

Bakterija MS se pokazala kao dobar bioindikator stanja i provedbe biosigurnosnih mjera na farmi kokoši nesilica. Primjena kombinacije dijagnostičkih postupaka omogućit će provedbu monitoringa na optimalan način. Rezultati ELISA testa dokazom specifičnih protutijela služe kao standard za dokaz prethodne zaraze te služe kao referenca za provedbu qPCR analize, dok qPCR metoda služi za dokaz rane zaraze jata te može ukazati na intenzitet širenja uzročnika na farmi.

## 6. ZAKLJUČCI

S ciljem kontrole prisutnosti MS na 4 farme kokoši nesilica proveden je monitoring kroz godinu dana, pri čemu su se kao metode dijagnostike koristili ELISA test i qPCR. Temeljem provedenog istraživanja može se zaključiti sljedeće:

- Analizom svih uzoraka iz 9 jata ustanovljena je visoka pozitivna razina korelacije između titra specifičnih protutijela za MS i broja kopija genoma u obrisku dušnika.
- Na razini pojedinih jata jedno je jato pokazalo statistički značajnu pozitivnu korelaciju, dok u drugim jatima nije dokazana značajna statistička korelacija, no viši titar je pratio i veći broj kopija genoma, kao i obrnuto, niži titar protutijela značio je i niži broj kopija genoma u obrisku dušnika.
- Izuzetak je jato sa visokim titrom protutijela i negativnim nalazom bakterija u obrisku, što moguće ukazuje na grešku prilikom uzorkovanja.
- Dokaz specifičnih protutijela ELISA testom služi kao dokaz prethodne zaraze jata te je indikator za provođenje qPCR postupka, dok qPCR služi kao dokaz rane zaraze jata.
- Dobiveni rezultati potvrđuju nužnost stalne kontrole na farmama u svrhu provedbe propisanih biosigurnosnih mjera te potrebu za provedbom drugih profilaktičkih mjera, poput cijepljenja, kako bi se provela zaštita kontroliranih jata.

## 7. LITERATURA

1. AVIAGEN (2018): Arbor Acres PS Handbook. [https://aviagen.com/assets/Tech\\_Center/AA\\_Broiler/AA-BroilerHandbook2018-EN.pdf](https://aviagen.com/assets/Tech_Center/AA_Broiler/AA-BroilerHandbook2018-EN.pdf) (15.1. 2024.)
2. DUFOUR-GESBERT, F., A. DHEILLY, C. MAROIS, I. KEMPF (2006): Epidemiological study on *Mycoplasma synoviae* infection in layers. *Vet. Microbiol.* 114, 148 – 154.
3. EWING, M. L., L. H. LAUERMAN, S. H. KLEVEN, M. B. BROWN (1996): Evaluation of diagnostic procedures to detect *Mycoplasma synoviae* in commercial multiplier-breeder farms and commercial hatcheries in Florida. *Avian Dis.* 40, 798 – 806.
4. FEBERWEE, A., J. J. DE WIT, W. J. LANDMAN (2009): Induction of eggshell apex abnormalities by *Mycoplasma synoviae*: field and experimental studies. *Avian Pathol.* 38, 77 – 85.
5. FERGUSON-NOEL, N., V. A. LAIBINIS, M. FARRAR (2012): Influence of Swab Material on the Detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* by Real-Time PCR. *Avian Dis.* 56, 310 – 314.
6. FERGUSON-NOEL, N. M., N. K. ARMOUR, A. H. NOORMOHAMMADI, M. EL-GAZZAR, J. M. BRADBURY (2020): Mycoplasmosis. *Dis Poult.* 13, 907 – 965.
7. FERGUSON-NOEL, N. M., S. M. WILLIAMS (2015): The efficacy of *Mycoplasma gallisepticum* K-strain live vaccine in broiler and layer chickens. *Avian Pathol.* 44, 75 – 80.
8. GOTTSTEIN, Ž., L. LOZICA, M. LUKAČ, D. VIDAS, A. HELL-KUREVIJA, D. HORVATEK TOMIĆ (2023): Monitoring reveals high prevalence of *Mycoplasma synoviae* in layer flocks in Croatia. *Vet. arhiv.* 93, 51 – 64.
9. HIGGINS, P. A., K. G. WHITHEAR (1986): Detection and differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* antibodies in chicken serum using enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Dis.* 30, 160 – 168.
10. HORVATEK TOMIĆ, D., L. LOZICA, G. NEDELJKOVIĆ, M. LUKAČ, E. PRUKNER-RADOVČIĆ, Ž. GOTTSTEIN (2018): Prevalence of *Mycoplasma synoviae* in layer poultry flocks in Croatia. *Proceedings of XV<sup>th</sup> European Poultry Conference*, 17. – 21. rujna, Dubrovnik, str. 639.

11. JANNI, K. (2017): Enhancing biosecurity using flow analysis and Danish entry concepts. <https://zootecnicainternational.com/featured/enhancing-biosecurity-using-flow-analysis-danish-entry-concepts>. (15.1. 2024.)
12. KABOUDI, K., A. JBENYENI (2019): *Mycoplasma synoviae* infection in layers: diagnoses and control measures-a review. *Vet. arhiv.* 12, 63 – 82.
13. KLEVEN, S. H., D. D. KING, D. P. ANDERSON (1972): Airsacculitis in broilers from *Mycoplasma synoviae*: effect on air-sac lesions of vaccinating with infectious bronchitis. *Avian Dis.* 16, 915 – 924.
14. KLEVEN, S. H. (2008): Control of avian mycoplasma infections in commercial poultry. *Avian Dis.* 52, 367 – 374.
15. KLEVEN, S. H., N. M. FERGUSON-NOEL (2008): *Mycoplasma synoviae* infection. *Diseases of poultry* 12. izd., (Saif, Y. M., A. M. Fadly, J. R. Glisson, L. R. McDougald, L. K. Nolan, D. E. Swayne, Ur.), Wiley-Blackwell Publishing, USA, str. 845 – 856.
16. KREIZINGER, Z., K. M. SULYOK, D. GROZNER, K. NILSSON, V. HRIVNAK, D. BENČINA, M. GYURANECZ (2017): Antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma synoviae* strains originating from Central and Eastern Europe. *BMC Vet. Res.* 13, 342.
17. KUO, H. C., D. Y. LO, C. L. CHEN, Y. L. TSAI, J. F. PING, C. H. LEE, P. A. LEEAND, H. G. CHANG (2017): Rapid and sensitive detection of *Mycoplasma synoviae* by an insulated isothermal polymerase chain reaction-based assay on a field-deployable device. *Poult. Sci.* 96, 35 – 41.
18. LANDMAN, W. J. (2014): Is *Mycoplasma synoviae* outrunning *Mycoplasma gallisepticum*? A viewpoint from The Netherlands. *Avian Pathol.* 43, 2 – 8.
19. LOCKABY, S. B., F. J. HOERR, L. H. LAUERMAN, S. H. KLEVEN (1998): Pathogenicity of *Mycoplasma synoviae* in Broiler Chickens. *Vet. Pathol.* 35, 178 – 190.
20. LOCKABY, S. B., F. J. HOERR, L. H. LAUERMAN, B. F. SMITH, A. M. SAMOYLOV, M. A. TOIVIO KINNUCAN, S. H. KLEVEN. (1999): Factors associated with virulence of *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis.* 43, 251 – 261.
21. MARKHAM, J. F., C. J. MORROW, P. C. SCOTT, K. G. WHITHEAR (1998a): Safety of a temperature-sensitive clone of *Mycoplasma synoviae* as a live vaccine. *Avian Dis.* 42, 677 – 681.
22. MARKHAM, J. F., C. J. MORROW, K. G. WHITHEAR (1998b): Efficacy of a temperature sensitive *Mycoplasma synoviae* live vaccine. *Avian Dis.* 42, 676.



23. MARKHAM, J. F., P. C. SCOTT, K. G. WHITEHEAR (1998c): Field evaluation of the safety and efficacy of a temperature-sensitive *Mycoplasma synoviae* live vaccine. Avian Dis. 42, 682 – 689.
24. MAROIS, C., J. P. PICAULT, M. KOBISCH, I. KEMPF. (2005): Experimental evidence of indirect transmission of *Mycoplasma synoviae*. Vet Res. 36, 759 – 769.
25. MATKOVIĆ, K., S. MATKOVIĆ (2006): Važnost čišćenja i dezinfekcije u peradarstvu. Meso. 2, 95– 99.
26. MATKOVIĆ, K., M. VUČEMILO, S. MATKOVIĆ, Ž. PAVIČIĆ, M. OSTOVIĆ (2013): Utjecaj mjera biosigurnosti na ponašanje i dobrobit tovnih pilića. Krmiva. 55, 115 – 121.
27. MORROW, C. J., J. F. MARKHAM, K. G. WHITEHEAR (1998): Production of temperature-sensitive clones of *Mycoplasma synoviae* for evaluation as live vaccines. Avian Dis. 42, 667 – 670.
28. OIE (2018): Avian mycoplasmosis. OIE Terrestrial Manual, str. 844-859 <http://www.oie.int/en/scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories> (21.1.2024.)
29. OPITZ, H. M. (1983): *Mycoplasma synoviae* infection in Maine's egg farms. Avian Dis. 27, 324 – 326.
30. PRUKNER-RADOVČIĆ, E., D. HORVATEK TOMIĆ, Ž. GOTTSTEIN (2017): Peradarstvo priručnik. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
31. RAVIV, Z., S. H. KLEVEN (2009). The development of diagnostic real-time TaqMan PCR for the four pathogenic avian mycoplasmas. Avian Dis. 53, 103 – 107.
32. RAVIV, Z., N. FERGUSON-NOEL, V. LAIBINIS, R. WOOTEN, S. H. KLEVEN (2007): Role of *Mycoplasma synoviae* in commercial layer *Escherichia coli* peritonitis syndrome. Avian Dis. 5, 685 – 690.
33. VUČEMILO, M. (2008): Higijena i bioekologija u peradarstvu. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

## 8. SAŽETAK

### **Poredbena analiza titra specifičnih protutijela u serumu i količine bakterije *Mycoplasma synoviae* u obrisku dušnika s ciljem poboljšanja biosigurnosnih mjera na farmama kokoši nesilica lake pasmine**

Lucija Kurevija

Bakterija *Mycoplasma synoviae* na farmama kokoši nesilica može uzrokovati pojavu bolesti dišnog sustava, promjena na sinovijalnim membranama te abnormalnost apeksa jajne ljuske i time znatno smanjiti proizvodnost jata i kvalitetu jaja, što može dovesti do velikih ekonomskih gubitaka. Sprječavanje unosa i širenja uzročnika zasniva se na pravilnom provođenju biosigurnosnih mjera. U tu je svrhu potrebno provoditi monitoring za koji najčešće koristimo ELISA test i qPCR. Dokaz specifičnih protutijela ELISA testom služi kao dokaz prethodne zaraze jata te je indikator za provođenje qPCR postupka, dok qPCR služi kao dokaz rane zaraze jata. Provođenjem ovih metoda dobiva se uvid u kvalitetu provođenja biosigurnosnih mjera na farmama. U ovom istraživanju utvrđivao se odnos specifičnih protutijela u serumu i broja kopija genoma u obrisku dušnika. Analizom rezultata svih jata međusobno dobivena je visoka pozitivna razina korelacije između titra specifičnih protutijela u serumu i broja kopija genoma bakterije MS u obrisku dušnika. Na razini pojedinih jata statistički značajna pozitivna korelacija prisutna je samo kod jednog jata, dok je kod drugih jata prisutna tendencija da je uz viši titar prisutan veći broj, kao i uz niži titar manji broj kopija genoma bakterije MS. Viši titrevi su dokazani u starijih jata, dok je kod mlađih jata obično utvrđen nizak titar i broj kopija genoma. Izuzetak je jedno jato kod kojeg je uz visok titar prisutan negativan nalaz genoma, što može ukazati na mogući propust pri uzorkovanju. Utvrđeni rezultati ukazuju na potrebu za kontinuiranim monitoringom MS na farmama uz jačanje biosigurnosnih mjera i primjenu cjepiva s ciljem istiskivanja divljih sojeva s farmi.

Ključne riječi: *Mycoplasma synoviae*, monitoring, ELISA, qPCR, biosigurnosne mjere

## **9. SUMMARY**

### **Comparative analysis of specific antibody titres in serum and quantity of *Mycoplasma synoviae* bacteria in tracheal swabs with the aim of enhancing biosecurity measures on layer hen farms**

Lucija Kurevija

Bacteria *Mycoplasma synoviae* on layer hen farms can cause respiratory diseases, changes on synovial membranes and abnormalities in the apex of the eggshell, and significantly reduce flock productivity and egg quality, what can lead to significant economic losses. Preventing the introduction and spread of the pathogen is based on proper implementation of biosecurity measures. For this purpose, it is useful to conduct monitoring most often using ELISA tests and qPCR. The evidence of specific antibodies via ELISA test serves as proof of previous flock infection and as an indicator for conducting qPCR, while qPCR serves as evidence of early flock infection. By implementing these methods, insight into the quality of biosecurity measures on farms is obtained. This study aimed to establish the relationship between titre of specific antibodies in serum and the number of genome copies of MS in tracheal swabs. Analysis of the results from all flocks revealed a high level of positive correlation between them. On the flock level significant positive correlation is present only in one flock, while in other flocks tendency is present which shows that higher titres are followed by higher number of genome copies, and vice versa. Usually higher titres are present in older, while lower titres in younger flocks. Exception is present in one flock in which despite high ELISA titre no genome copies are detected, what could be the error during the sampling. Achieved results confirm the need for continuous monitoring of MS on layer farms with strengthening of biosecurity measures and application of vaccines with the aim of elimination of wild strain from the farms.

Keywords: *Mycoplasma synoviae*, monitoring, ELISA, qPCR, biosecurity measures

## **10. ŽIVOTOPIS**

Rođena sam 11.7.1997. godine u Zagrebu. Završila sam Isusovačku klasičnu gimnaziju s pravom javnosti u Osijeku te 2016. godine upisala Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. U X. semestru opredijelila sam se za usmjerenje Farmske životinje i konji. Tijekom šeste godine studija odradila sam terensko-stručni rad u veterinarskoj ambulanti Vetam u Osijeku. Apsolventsku godinu provela sam radeći na Radio Kampusu u Splitu i Zabavnom radiju u Zagrebu.