

# Dokaz i komparativna kvantifikacija sojeva *Gallibacterium anatis* i *Mycoplasma synoviae* iz obrisaka dušnika lakih i teških linija kokoši qPCR postupkom

---

**Buzaljko, Silvia**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*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:178:132584>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-08**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET**

**Silvia Buzaljko**

**Dokaz i komparativna kvantifikacija sojeva *Gallibacterium anatis* i *Mycoplasma synoviae*  
iz obrisaka dušnika lakih i teških linija kokoši qPCR postupkom**

***Diplomski rad***

**Zagreb, 2020.**

**Zavod za bolesti peradi s klinikom**  
**Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu**

**Predstojnik:** Doc. dr. sc. Željko Gottstein

**Mentor:** doc. dr. sc. Željko Gottstein

**Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:**

1. Dr. sc. Maja Lukač, dr. med. vet.
2. Izv. prof. dr. sc. Danijela Horvatek Tomić
3. Doc. dr. sc. Željko Gottstein
4. Prof. dr. sc. Ljubo Barbić (zamjena)

## **Zahvala**

Ovom prilikom željela bih se zahvaliti svima koji su pomogli izradi ovog diplomskog rada, prvenstveno svom mentoru doc. dr. sc. Željku Gottsteinu na odabiru teme, uloženom vremenu, savjetima te stručnom vodstvu.

Zahvaljujem se tehničkom osoblju Zavoda na velikoj pomoći prilikom praktičnog dijela izrade rada.

Posebno hvala mojoj obitelji na neograničenoj potpori u svemu što radim u životu i razumijevanju tijekom studija.

Također, veliko hvala mojim prijateljima uz koje sam lakše ovaj studij uspješno privela kraju.

## Popis slika

**Slika 1.** Srednja vrijednost kopija genoma *Gallibacterium anatis* (GA) i *Mycoplasma synoviae* (MS) po obrisku (Srednja vrijednost  $\pm$  SD)

**Slika 2.** Korelacija između broja kopija genoma *Gallibacterium anatis* (GA) i *Mycoplasma synoviae* (MS) po obrisku na pojedinim farmama

**Slika 3.** Korelacija prevalencije *Gallibacterium anatis* (GA) i *Mycoplasma synoviae* (MS) na pojedinim farmama

**Slika 4.** Usporedba prosječnog broja genoma po obrisku između vrsta *Mycoplasma synoviae* i *Gallibacterium anatis*. Statistički značajne razlike označene različitim slovima abecede (a,b).

## Popis tablica

**Tablica 1.** Sekvence korištenih početnica i proba za dokaz i kvantifikaciju sojeva *Gallibacterium anatis* i *Mycoplasma synoviae*

**Tablica 2.** Srednja vrijednost kopija genoma *Gallibacterium anatis* (GA) i *Mycoplasma synoviae* (MS) po obrisku uz dob kokoši na pojedinim farmama (Srednja vrijednost  $\pm$  SD)

## SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA	1
2.1. <i>Gallibacterium anatis</i>	1
2.2. <i>Mycoplasma synoviae</i>	2
3. MATERIJALI I METODE	3
3.1. Uzorci za izdvajanje DNK	3
3.2. Izdvajanje DNK	3
3.3. Analiza izdvojene DNK primjenom qPCR reakcije	4
3.4. Statistička analiza	4
4. REZULTATI	5
5. RASPRAVA	10
6. ZAKLJUČCI	12
7. LITERATURA	12
8. SAŽETAK	15
9. SUMMARY	16
10. ŽIVOTOPIS	17

## 1. UVOD

Peradarska proizvodnja najrašireniji je dio prehrambene industrije, a piletina je meso koje se najviše konzumira (NHUNG i sur., 2017.). Razlozi za to su relativno niski troškovi proizvodnje (REALPE ARANDA i sur., 2019.) te nepostojanje religioznih ni kulturoloških restrikcija (NHUNG i sur., 2017.), no masovna proizvodnja povećava rizik od bolesti (COLLET i sur., 2020.). Zarazne bolesti uzrokovane *Gallibacterium anatis* i *Mycoplasma synoviae* uzrokuju velike ekonomske gubitke u peradarstvu. Tako je *Mycoplasma synoviae* najčešći preduvjet za izbijanje drugih bakterijskih bolesti pri čemu se *Gallibacterium anatis*, koja je inače komenzal u gornjim dišnim prohodima, može lako proširiti u donje dijelove dišnog sustava ili kroz jajovod ascedentno do abdominalne šupljine. Cilj ovog rada utvrditi je prevalenciju *Gallibacterium anatis* i *Mycoplasma synoviae* na pretraživanim farmama, kao i međusobnu korelaciju količine patogena, budući navedeni podaci ne postoje. Dobiveni rezultati će biti korisni za praćenje dinamike zaražavanja i kretanja titra uzročnika u različitim dobnim skupinama, a u svrhu poboljšanja imunoprofilakse i biosigurnosnih mjera na farmama te smanjenja ekonomskih gubitaka.

## 2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

### 2.1. *Gallibacterium anatis*

*Gallibacterium* je rod u porodici *Pasteurellaceae* (WANG i sur., 2016.; HUANGFU i sur., 2017.) i karakteriziran je visokim nivoom fenotipske i genske raznolikosti (WANG i sur., 2016.). Bakterija *Gallibacterium anatis* je Gram-negativna, kokobacilarna bakterija koja je normalno prisutna u gornjem dišnom sustavu te donjem dijelu genitalnog trakta (CHAVEZ HERNANDEZ, 2014.). Izolirana je iz goveda, svinja, purana, golubova, prepelica, fazana i čovjeka, a smatra se da najštetnije utječe na nesivost kokoši nesilica i da je uzrok povišenja stope mortaliteta tovnih pilića. Izaziva pad nesivosti i slabiju kvalitetu jaja, visok mortalitet i ozbiljne ekonomske gubitke u kratkom razdoblju (HUANGFU i sur., 2017.). S obzirom na to da je ova bakterija oportunistički patogen, najbitnija je primjena biosigurnosti (LOZICA i sur., 2020.). Pod predisponirajuće čimbenike spadaju neprikladni zoohigijenski uvjeti, stres, poremećaji imunskog i hormonskog sustava, genetika i infekcije drugim mikroorganizmima (LOZICA i sur., 2019.). Faktori virulencije *G. anatis* su kapsula, vezikule vanjske membrane, fimbrije, metaloproteaze, formiranje biofilma te hemaglutinin. Patogeneza počinje adherencijom i kolonizacijom, a kada se pričvrsti, razmnožava se i sintetizira faktore

virulencije (KRISHNEGOWDA i sur., 2020.). Klinička slika uključuje depresiju, proljev i pad nesivosti koji se često javlja bez kliničke slike (LOZICA i sur., 2019.). Uzrokuje purulentni salpingitis i ooforitis te se u kroničnim slučajevima može naći i purulentni peritonitis (CHAVEZ HERNANDEZ, 2014.). Kod imunosupresije ulazi u cirkulaciju i dolazi do septikemije što dovodi do upale u raznim organima, do perikarditisa, perihepatitisa, nekroze jetre, ooforitisa, degeneracije folikula, enteritisa i upale gornjeg dišnog sustava (KRISHNEGOWDA i sur., 2020.). Na razudbi se uočavaju peritonitis, hepatitis i salpingitis, a bez obzira na prisutnost *G.anatis* u zdravih kokoši i činjenicu da se bolest može izazvati eksperimentalno, rijetko se *G.anatis* izolira iz uginulih kokoši s tipičnim lezijama (WANG i sur., 2016.). Kod *G.anatis* primijećen je brzi razvoj rezistencije na antimikrobne pripravke odnosno multirezistentnost na tetracikline, streptomycin, trimetoprim-sulfametoksazol i kinolone (LOZICA i sur., 2019.). Za sada nema komercijalnog cjepiva za *G.anatis* (COLLET i sur., 2020.).

## 2.2. *Mycoplasma synoviae*

Mikoplazme spadaju u razred Mollicutes i red Mycoplasmatales, evoluirale su iz kompleksnijih Gram-pozitivnih bakterijskih prethodnika te je njihov genom najmanji poznati među slobodno živućim i samoreplicirajućim organizmima i nemaju staničnu stijenku (RAVIV I KLEVEN, 2008.; ANNON., 2015.). Imaju afinitet za sluznice i specifične su za domaćina (LANDMAN, 2014.). Bakterija *Mycoplasma synoviae* uzrokuje subkliničku zarazu gornjih dišnih puteva, a može biti i sistemna zaraza čija je posljedica akutni ili kronični sinovitis kokoši i purana (HORVATEK TOMIĆ i sur., 2012.). Iako primarno zahvaća kokoši i purane, ima najširi raspon domaćina od svih mikoplazmi (GHARIBI i sur., 2018.; CHAVEZ HERNANDEZ, 2014.). Uz sinovitis, sistemska zaraza očituje se i padom nesivosti i/ili kvalitete jaja. Počinje kao respiratorna infekcija što uzrokuje blagu upalu zračnih vrećica, a to dovodi do pojave sekundarnih respiratornih patogena (ANNON., 2015.). Do egzacerbacije respiratorne infekcije uzrokovane ovom mikoplazmom dolazi ako se uz nju javi i neki respiratorni virus (GHARIBI i sur., 2018.). Postoji jedan serotip i izdvojeni sojevi su slični, ali variraju po virulenciji i tropizmu (HORVATEK TOMIĆ i sur., 2012.; CHAVEZ HERNANDEZ, 2014.). *M.synoviae* može uzrokovati respiratorne lezije te supurativni i kazeozni artritis (CHAVEZ HERNANDEZ, 2014.). Širi se horizontalno i vertikalno te je vertikalni način širenja najvažniji. Ptice šire mikoplazmu i ostaju zaražene cijeli svoj životni vijek. Najbolja metoda za sprječavanje i vertikalnog i horizontalnog širenja je eliminacija inficiranih jata (LANDMAN, 2014.). Zaraza ovom mikoplazmom proširena je po cijelom svijetu te se bolest nalazi na OIE listi (FERGUSON - NOEL



i sur., 2020.). Inkubacija traje između 11 i 21 dana, a klinička slika očituje se u pilića starih 4 do 16 tjedana i to blijedom krestom, šepavošću, usporenim rastom, a potom i oteklinama zglobova nogu i mekušićima, dehidracijom, zelenkastim proljevom. Zimi se uz smanjen prirast i potrošnju hrane javljaju upale zračnih vrećica. Smrtnost je oko 1%, a povećava ju kanibalizam (HORVATEK TOMIĆ i sur., 2012.). Mikoplazme peradi povezane su i s deformacijom skeleta i embrionalnom smrtnošću (RAVIV I KLEVEN, 2008.). Na razudbi se u zglobovima nalazi viskozni do kazeozni eksudat koji se širi uz tetive i mišićje dok su bubrezi, slezena i jetra povećani, a zračne vrećice upaljene. Dokaz specifičnih protutijela komercijalnim ELISA kitovima najčešće se koristi u dijagnostici, a za njihov razvoj potrebno je 2 do 4 tjedna (HORVATEK TOMIĆ i sur., 2012.), dok PCR i qPCR služe za potvrdu zaraze (MUHAMMAD i sur., 2018.). Mikoplazma se ne može ukloniti iz jata, a sinovitis i upale zračnih vrećica rješavaju se antibioticima (HORVATEK TOMIĆ i sur., 2012.). Većina antibiotika djeluje na mikoplazme, a rezistentne su na one koji ometaju sintezu stanične stijenke (GHARIBI i sur., 2018.). Cijepljenje, kao dio programa kontrole *M.synoviae* uz provođenje mjera biosigurnosti, monitoringa i poštivanje načela "sve unutra - sve van", svodi upotrebu antibiotika na minimum. Najefektivnijom strategijom pokazala su se živa, atenuirana termolabilna cjepiva. Soj MS-H osigurava boravak u gornjim dišnim prohodima na nižoj temperaturi gdje potiče lokalnu imunosnu reakciju i sprječava ulazak patogenog soja, a ne može se proširiti u organizam jer raste na višoj temperaturi te se primjenjuje okulonazalno (CARGILL, 2016.).

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Uzorci za izdvajanje DNK**

Budući je zaražavanje ovim bakterijama u pravilu karakteristično za horizontalno širenje i uzrokuje probleme u starijih kategorija, pretragom su obuhvaćene nesilice konzumnih jaja i rasplodna jata u završnoj fazi uzgoja i u proizvodnji kako bi se mogla pratiti dinamika zaražavanja. Od kokoši po objektu uzeto je po 5 obrisaka dušnika koji su do izdvajanja DNK čuvani na -20 °C.

#### **3.2. Izdvajanje DNK**

Iz svakog obriska dušnika izdvojena je ukupna DNK primjenom komercijalnog kita za izdvajanje GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma, Njemačka) prema uputama proizvođača, a izdvojena DNK je do analize čuvana na -20 °C.

### 3.3 Analiza izdvojene DNK primjenom qPCR reakcije

Budući je uzimanje obriska dušnika provedeno tehnički na identičan način, kao i kasnije izdvajanje DNK komercijalnim kitom, koncentracija DNK je provjerena, no nije ujednačavana budući nije bilo značajnih razlika kako se ne bi utjecalo na krajnju koncentraciju u svakom uzorku. Za kvantifikaciju je korišten kit GoTaq® Probe qPCR Master Mix (Promega, SAD) na uređaju Mx3005P (Stratagene, SAD). Reakcija za svaki uzorak u volumenu od 15 µL je provedena u duplikatu, pri čemu je u svrhu apsolutne kvantifikacije u triplicatu paralelno rađen i uzorak za *Gallibacterium anatis* i *Mycoplasma synoviae* poznate koncentracije. Za kvantifikaciju su korištene poznate početnice i probe (Tablica 1).

### 3.4. Statistička analiza

Normalnost raspodjele vrijednosti testirana je Kolmogorov-Smirnov testom te je prosječan broj kopija genoma testiran neparametrijskim Mann-Whitney U testom, a korelacija između titra uzročnika kao i korelacija između prevalencije uzročnika na pojedinoj farmi analizirana je primjenom Spearman rank testa korištenjem računalnog programa Statistica 13 (Tibco, SAD).

Tablica 1. Sekvence korištenih početnica i proba za dokaz i kvantifikaciju sojeva *Gallibacterium anatis* i *Mycoplasma synoviae*

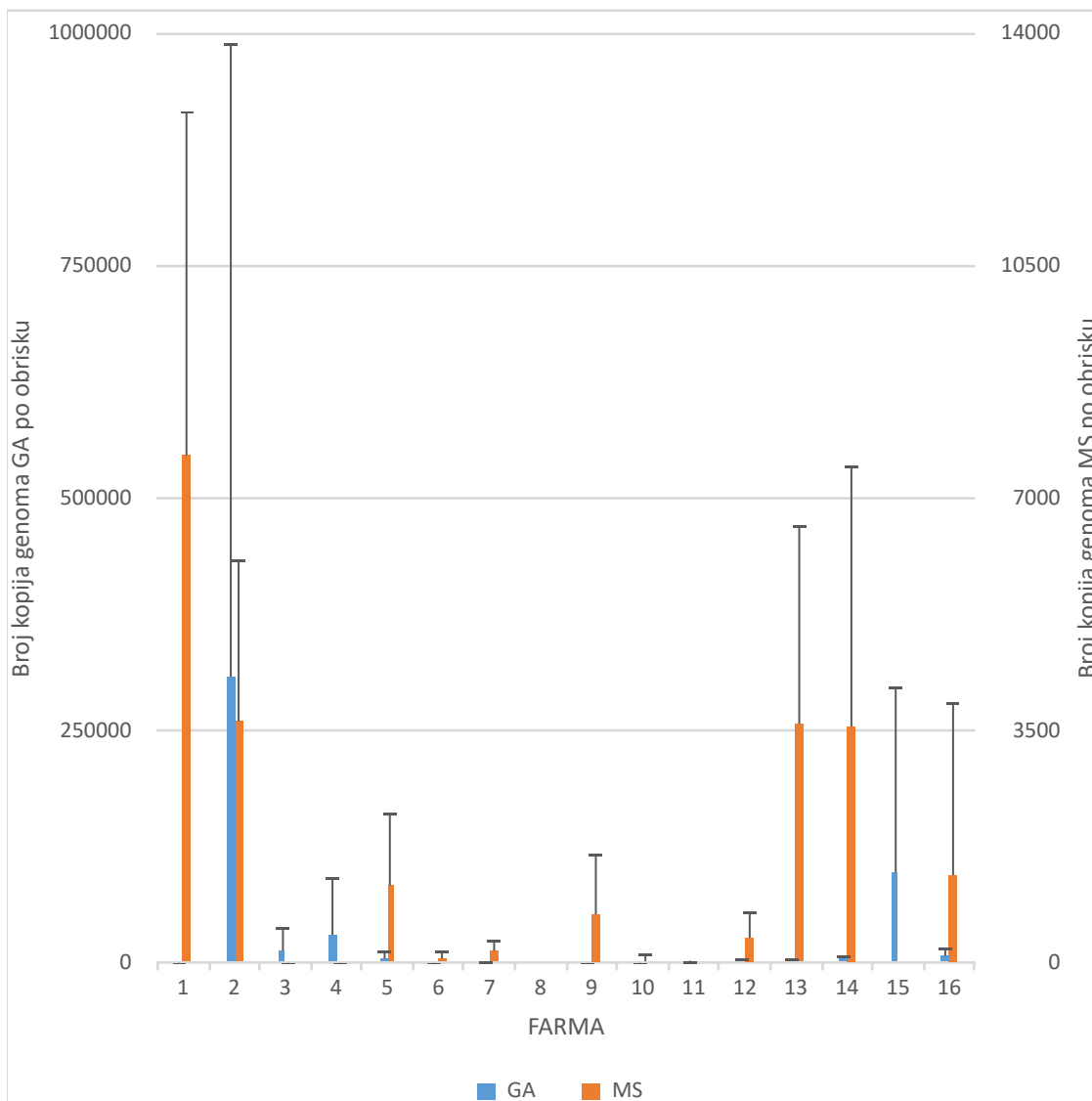
Naziv početnice/probe	Sekvenca i modifikacija	Izvor
MS-F	5'-CTAAATACAATAGCCCAAGGCAA	RAVIV I KLEVEN, 2008.
MS-R	5'-CCTCCTTTCTTACGGAGTACA	
MS-P	5'-FAM-AGCGATACACAACCGCTTTTAGAAT-BHQ1	
GA-F	5'-CGATTGTGTCCGTTAAAGTGC	WANG i sur., 2016.
GA-R	5'-TGCAAACGCTCACACCAACTG	
GA-P	5'- FAM-CTGGTTTCTTCCGAAGTGAAAAGTGTAGTGGA-BHQ1	

#### 4. REZULTATI

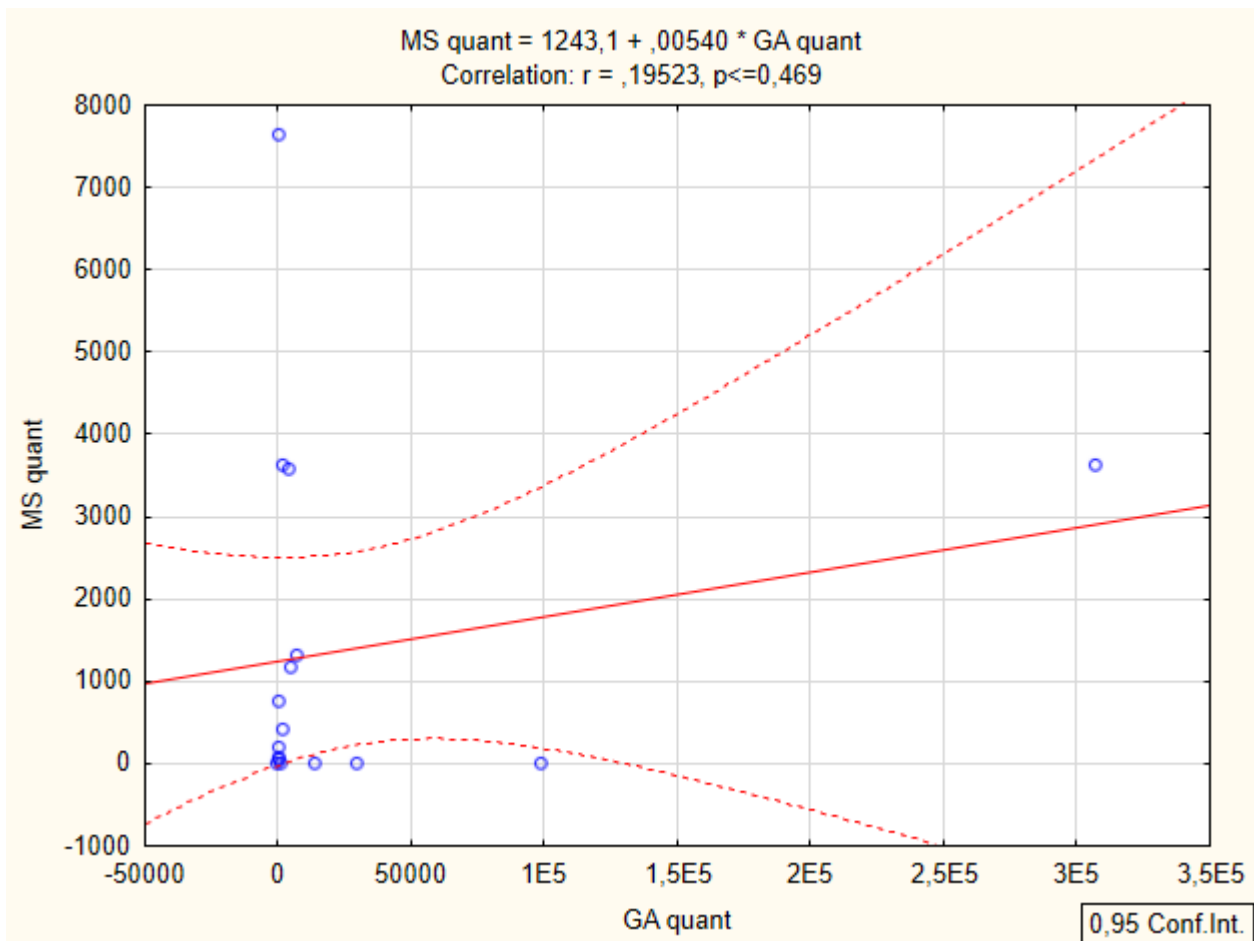
Istraživanje je provedeno na šesnaest jata od osam različitih vlasnika. Vidljiva je prisutnost oba patogena kod većine vlasnika. U jednom jatu, kod vlasnika označenog slovom C (tablica 2) nije dokazan niti jedan od patogena. Jato koje je negativno na oba patogena ujedno je i najmlađe jato od svih testiranih u ovom istraživanju (8 tjedana). Također, u dva jata je detektirana samo *Gallibacterium anatis* i to kod vlasnika koji je u tablici 2 označen slovom E i na jednom od dva pretraživana jata vlasnika označenog slovom H, ako i vrlo niska, gotovo negativna količina kod jata 3 i 4 vlasnika A. Na slici 1 prikazan je prosječan broj kopija genoma po obrisku te rezultati idu u korist *Gallibacterium anatis* koja postiže u prosjeku više titreve na pojedinim farmama po uzorku, no prosječna ukupna količina patogena po uzorku značajno je veća za *Gallibacterium anatis* u odnosu na *Mycoplasma synoviae* (Slika 4). No, korelacija s obzirom na broj patogena u uzorku nije potvrđena (Slika 2). No, potvrđena je korelacija u prevalenciji uzročnika na farmama (Slika 3), što moguće potvrđuje međusobnu povezanost ovih uzročnika.

Tablica 2. Srednja vrijednost kopija genoma *Gallibacterium anatis* (GA) i *Mycoplasma synoviae* (MS) po obrisku uz dob kokoši na pojedinim farmama (Srednja vrijednost  $\pm$  SD)

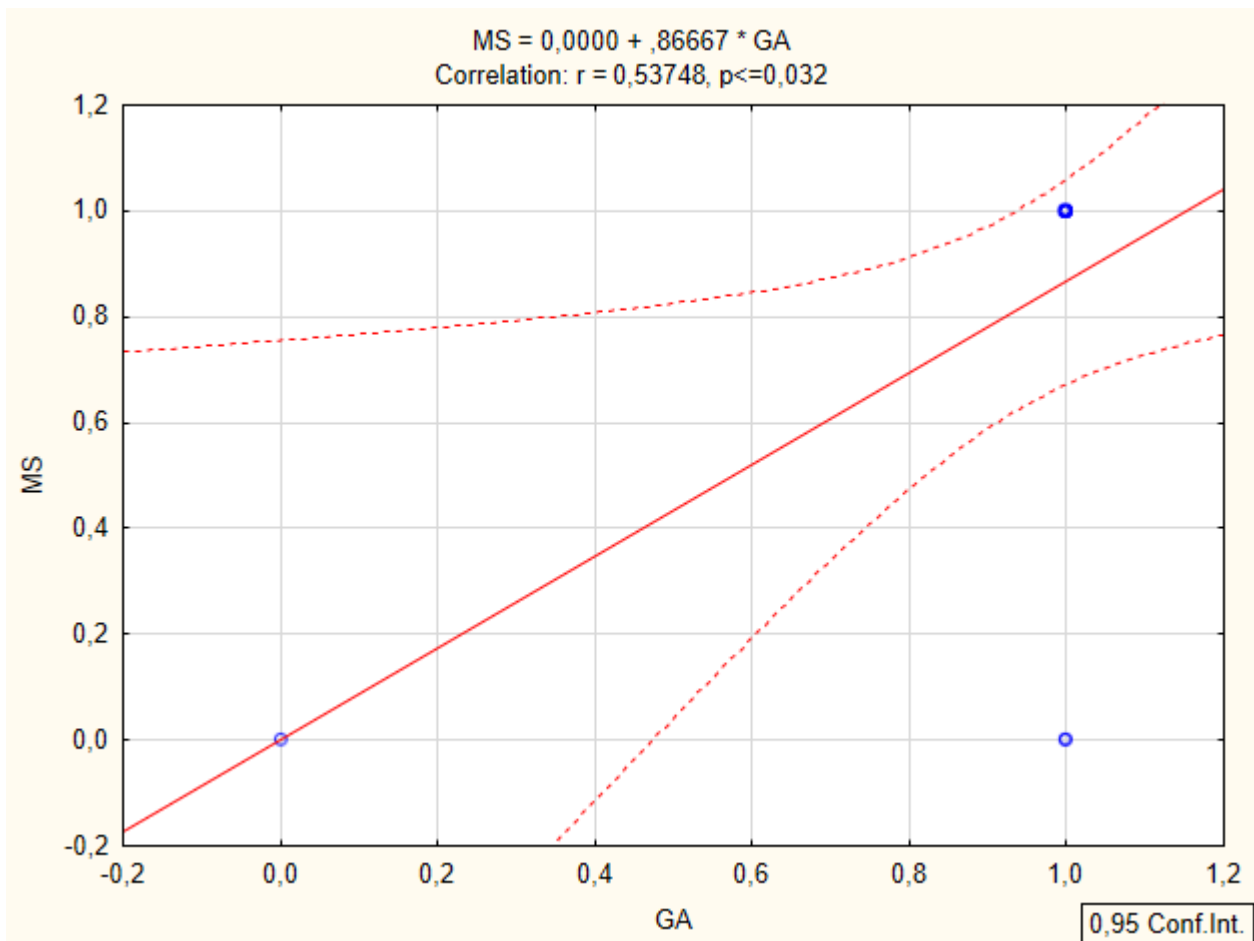
VLASNIK	FARMA	GA	MS	DOB (tjedni)
A	1	388 $\pm$ 534	7645 $\pm$ 5166	41
	2	307040 $\pm$ 683548	3628 $\pm$ 2441	41
	3	13596 $\pm$ 25438	3 $\pm$ 3	49
	4	29374 $\pm$ 63502	1 $\pm$ 3	49
	5	4856 $\pm$ 8633	1175 $\pm$ 1114	60
B	6	111 $\pm$ 158	73 $\pm$ 127	60
	7	502 $\pm$ 640	191 $\pm$ 177	19
C	8	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	8
	9	69 $\pm$ 71	754 $\pm$ 893	30
D	10	41 $\pm$ 65	51 $\pm$ 98	66
E	11	1126 $\pm$ 1838	0 $\pm$ 0	33
F	12	1804 $\pm$ 2219	400 $\pm$ 363	29
	13	1800 $\pm$ 3266	3615 $\pm$ 2991	36
G	14	3974 $\pm$ 5222	3578 $\pm$ 3914	38
H	15	99196 $\pm$ 197976	0 $\pm$ 0	26
	16	6863 $\pm$ 8341	1313 $\pm$ 2599	42



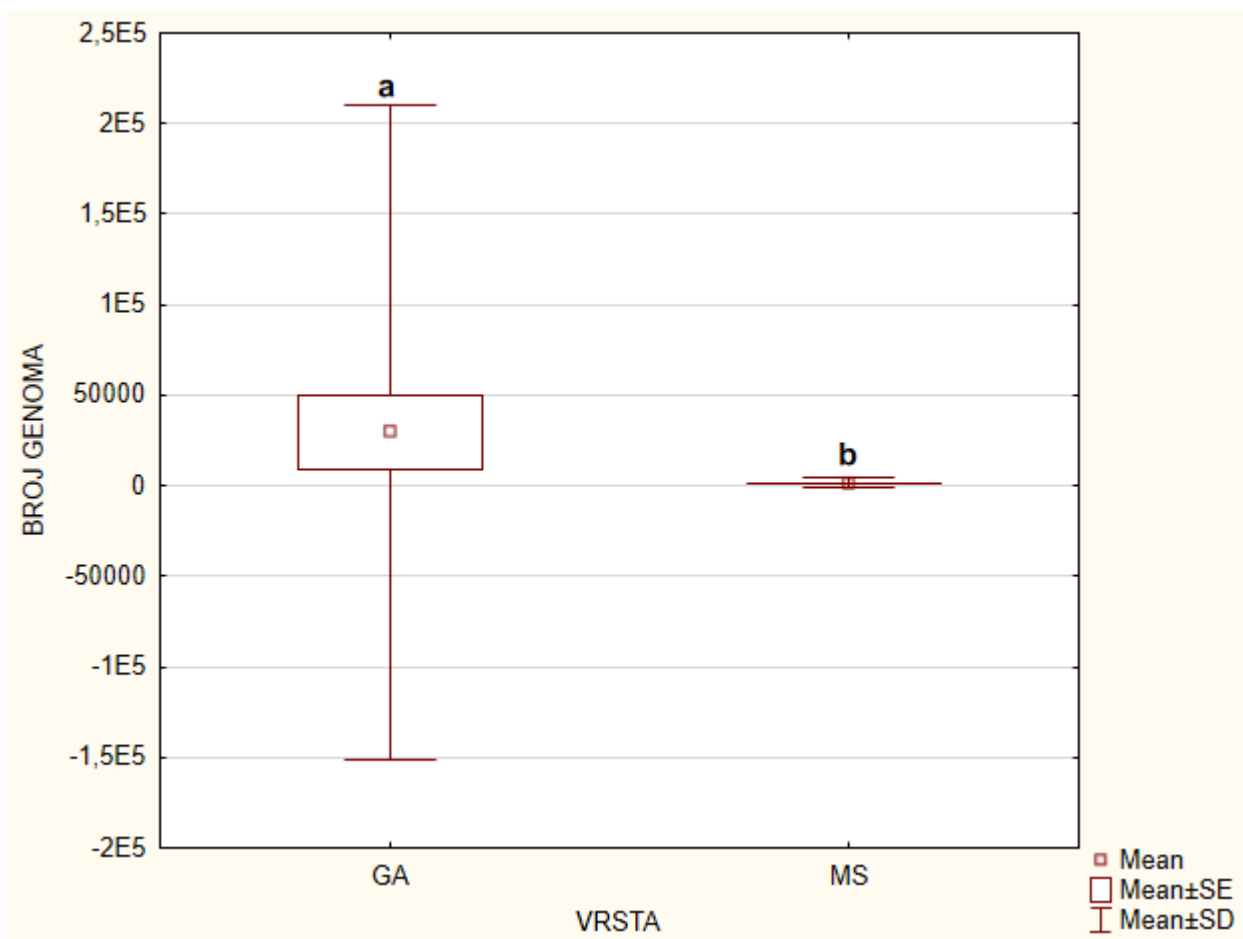
Slika 1. Srednja vrijednost kopija genoma *Gallibacterium anatis* (GA) i *Mycoplasma synoviae* (MS) po obrisku (Srednja vrijednost ± SD)



Slika 2. Korelacija između broja kopija genoma *Gallibacterium anatis* (GA) i *Mycoplasma synoviae* (MS) po obrisku na pojedinim farmama



Slika 3. Korelacija prevalencije *Gallibacterium anatis* (GA) i *Mycoplasma synoviae* (MS) na pojedinim farmama



Slika 4. Usporedba prosječnog broja genoma po obrisku između vrsta *Mycoplasma synoviae* i *Gallibacterium anatis*. Statistički značajne razlike označene različitim slovima abecede (a,b).

## 5. RASPRAVA

Predmet ovog istraživanja bio je utvrditi moguću korelaciju u broju uzročnika kao i prevalenciji vrsta *Mycoplasma synoviae* i *Gallibacterium anatis* u dušniku konzumnih nesilica i kokoši teške pasmine. Obje bakterije koloniziraju respiratorni trakt, a miješana infekcija znači i veću šansu za kliničku manifestaciju bolesti i posljedično veće gubitke od onih kod infekcije uzrokovane jednim patogenom (ABDELAZIZ i sur., 2019.; SUN i sur., 2017.). *Mycoplasma synoviae* dovodi do promjena u mehanizmu smrti stanice (DUŠANIĆ i sur., 2012.), a nedostatak stanične stijenke čini ju lako spojivom s membranama stanica domaćina. Mikoplazme utječu i na endosomalni sustav stanice domaćina (HU i sur., 2014.) i posjeduju enzim enolazu koji ima važnu ulogu u regulaciji transkripcije i može rezultirati imunosupresijom. Utvrđeno je da zaražavanje s *Mycoplasma gallisepticum* može otežati sliku nakon zaražavanja drugim patogenima na sluznici dušnika (SID i sur., 2016).



Osim katalitičke aktivnosti, enolaza potpomaže i adheziju na stanicu domaćina (BAO i sur., 2014.). U drugim studijama nije uspoređivana međusobna ovisnost *Mycoplasma synoviae* i *Gallibacterium anatis*, ali su u nekima istraživani drugi patogeni koji djeluju zajedno s *M. synoviae* i dovode do izraženijih kliničkih znakova (GHARIBI i sur., 2018.).

Rezultatima ove studije dokazana je statistički značajna korelacija u prevalenciji uzročnika po farmama, no ne postoji međusobna korelacija između broja dokazanih mikroorganizama. Također je vidljivo da je vrsta *Gallibacterium anatis* češća vrsta u obriscima dušnika te da prosječno postiže značajno više titreve po obrisku nego *Mycoplasma synoviae*. Ovo ide u prilog da je vrsta *Gallibacterium anatis* komenzal u gornjim dišnim prohodima i da u njima može boraviti u visokim titrevima bez izazivanja patoloških promjena. Budući nam nisu bili poznati klinički simptomi kod uzorkovanih kokoši, kao niti biosigurnosni uvjeti na farmama, bilo bi potrebno provesti detaljnu analizu povezujući dobivene rezultate s navedenim parametrima kako bi se moguće dobila povezanost s lošim uvjetima ili probojem bolesti s obzirom da je opisana povezanost varijabilnosti sojeva *G. anatis* i loših biosigurnosnih uvjeta (LOZICA i sur., 2020.) Rezultati istraživanja potvrda su sve većih izazova koje nameću ovakve bolesti peradi te je potrebno biti u korak s njima to jest razvijati dijagnostiku, kontrolu i metode prevencije. Od životinja u proizvodnji očekuje se da ostvare svoj genetski potencijal, a da bi se to dogodilo moraju biti zdrave i živjeti u odgovarajućim uvjetima. Bakterijske bolesti peradi, pogotovo multifaktorijalne, predstavljaju velik izazov i treba ih prevenirati. Izazov se sastoji u tome što se povlačenjem antibiotika iz hrane povećalo korištenje antibiotika za liječenje te se stvara rezistencija. Stoga je važna rana detekcija bolesti koja se postiže čestim testiranjem velikog uzorka populacije (COLLET i sur., 2020.). Imunoprofilaksa je jedna od najvažnijih tehnoloških postupaka u prevenciji bolesti u peradarstvu. Upravo postojanje cjepiva i njihova primjena osiguravaju uspješnost proizvodnje. Za *M. synoviae* postoji cjepivo koje se pokazalo vrlo učinkovitim u zaštiti od kliničkih simptoma kao i u istiskivanju divljih sojeva na farmi (CARGILL, 2016). U slučaju *G. anatis*, velika varijabilnost sojeva ne osigurava mogućnost prevencije univerzalnim komercijalnim cjepivom, već izrada i primjena autogenog cjepiva može osigurati prihvatljivu zaštitu (LOZICA i sur., 2020.). Ovim istraživanjem dokazano je da je prevalencija oba uzročnika na farmama visoka i da je potreban monitoring kako bi se uzročnike dokazalo i u kojem su broju prisutni. Ovo je osobito važno u slučaju *M. synoviae* budući asimptomatska zaraza čini najviše gubitaka i zbog specifičnosti uzročnika omogućava longitudinalno širenje kroz jata što u konačnici dovodi do velike štete u proizvodnji. Stoga naročitu pažnju treba posvetiti monitoringu i jačanju biosigurnosti na farmama, koja je osnova peradarstva, kako bi se proizvodni ciklus mogao provesti bez značajnih gubitaka.

## 6. ZAKLJUČCI

- Na pretraživanim farmama postoji statistički značajna korelacija u prevalenciji to jest prisutnosti oba uzročnika na farmama
- Nema korelacije s obzirom na broj patogena u uzorku
- Dokazan je prosječno značajno veći broj stanica *Gallibacterium anatis* u odnosu na *Mycoplasma synoviae* u analiziranom uzorku

## 7. LITERATURA

1. ABDELAZIZ, A.M., M.H.A. MOHAMED, M.M. FAYEZ, T. AL-MARRI, I. QASIM, A.A. AL-AMER (2019): Molecular survey and interaction of common respiratory pathogens in chicken flocks (field perspective). Vet. World. 12, 1975 - 1986.
2. ANNON. (2015): [https://5mpublishing.sirv.com/poultry/legacy/focus/contents/msd/ThePoultrySite/GL\\_NML\\_0216\\_0001.pdf](https://5mpublishing.sirv.com/poultry/legacy/focus/contents/msd/ThePoultrySite/GL_NML_0216_0001.pdf) (informational sheet)
3. BAO, S., X. GUO, S. YU, J. DING, L. TAN, F. ZHANG, Y.SUN, X. QIU, G. CHEN, C. DING (2014): *Mycoplasma synoviae* enolase is a plasminogen/ fibronectin binding protein. BMC Vet. Res. 10, 223.
4. CARGILL, P. (2016): Vaccination against *Mycoplasma synoviae* using MS-H strain, live temperature sensitive vaccine. Pharmsure International Ltd., UK, <https://pharmsure.net/app/uploads/2016/12/Pharmsure-MSH-vaccine.pdf> , 1-12.
5. COLLET, S.R., J.A. SMITH, H. BOULIANNE, R.L. OWEN, E.GINFERICH, R.S. SINGER, T.J. JOHNOSON, C.L. HOFACRE, R.D. BERGHAUS, B. STEWART - BROWN (2020): Principles of disease prevention, diagnose and control. U: Diseases of Poultry 14th ed. (Swayne, D.E., M. Boulianne, C.M. Logue, L.R. McDougald, V. Nair, D.L. Suarez). John Wiley and Sons, inc. Hoboken. USA. str. 3-68.

6. CHAVEZ HERNANDEZ, A.J. (2014): Poultry and avian diseases. Encyclopedia of Agriculture and Food Systems 4, str. 504-520.
7. DUŠANIĆ, D., D. BENČINA, I. OVEN, I. CIZELJ, M. BENČINA, M. NARAT (2012): *Mycoplasma synoviae* induces upregulation of apoptotic genes, secretion of nitric oxide and appearance of an apoptotic phenotype in infected chicken chondrocytes. Vet. Res. 43, 7.
8. FERGUSON - NOEL, N., A.H. NOORMOHAMMADI, N.K.ARMOUR, M. EL - GAZZAR, J.M. BRADBURY (2020): Mycoplasmosis. U: Diseases of Poultry 14th ed. (Swayne, D.E., M. Boulianne, C.M. Logue, L.R. McDougald, V. Nair, D.L. Suarez). John Wiley and Sons, inc. Hoboken. USA. str. 924-929.
9. GHARIBI, D., R. GHADIMIPOUR, M. MAYAHI (2018): Detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* among commercial poultry in Khuzestan province, Iran. Archives of Razi Institute, 73, 139 – 146.
10. HORVATEK TOMIĆ, D., Z. BIĐIN, E. PRUKNER-RADOVČIĆ (2012): Bolesti peradi U: Veterinarski priručnik, 6. izdanje (Herak-Perković, V., Ž. Grabarević, J. Kos). Medicinska naklada. Zagreb. str.1712.
11. HU, X., J. YU, X. ZHOU, Z. LI, Y. XIA, Z. LUO, Y. WU (2014): Synergism between upregulation of Rab7 and inhibition of autophagic degradation caused by mycoplasma facilitates intracellular mycoplasma infection. Mol. Med. Rep. 9, 793 - 800.
12. HUANGFU, H., W. XU, H. WANG, Q. DONG, H. GUO, Y. SUN, Y. LI, W. GAO, W. WANG, J. ZHANG, J. SHI, H. PAN, C. LI, L. WANG (2017): Detection of *Gallibacterium anatis* by Taq-Man fluorescent quantitative PCR. Avian Pathology, 47.
13. KRISHNEGOWDA, D.N., K. DHAMA, A.K. MARIAPPAN, P. MUNUSWAMY, M.I. YATOO, R. TIWARI, K. KARTHIK, P. BHATT, M.R. REDDY (2020). Etiology, epidemiology, pathology and advances in diagnosis, vaccine development and treatment of *Gallibacterium anatis* infection in poultry: A review. Vet.Q. 40, 16-34.

14. LANDMAN, W.J.M. (2014): Is *Mycoplasma synoviae* outrunning *Mycoplasma gallisepticum*? A viewpoint from the Netherlands. *Avian Pathology*, 43, 2-8.
15. LOZICA, L., M.A. LIYEMO, D. HORVATEK TOMIĆ, Ž. GOTTSTEIN (2019): Infekcija bakterijom *Gallibacterium anatis* u kokoši nesilica. *Hrv. Vet. Vjesnik* 27, 1-2.
16. LOZICA, L., S. KAZAZIĆ, Ž. GOTTSTEIN (2020): High phylogenetic diversity of *Gallibacterium anatis* is correlated with low biosecurity measures and management practice on poultry farms. *Avian pathology*, 49, 1-9.
17. MUHAMMAD, F., J. HUSSAIN, S.K. FAREED, T. AHMED KHAN, S. AHMED KHAN, A. AHMAD (2018): Diagnosis of avian mycoplasmas: A comparison between PCR and culture technique. *Archives of Razi Institute* 73, 239 – 244.
18. NHUNG, N.T., N. CHANSIRIPORNCHAI, J.J. CARRIQUE – MAS (2017): Antimicrobial resistance in bacterial poultry pathogens: A review. *Front Vet Sci.* 4, 126.
19. RAVIV, Z., S.H. KLEVEN (2008): The development of diagnostic real-time TaqMan PCRs for the four pathogenic avian mycoplasmas. *Avian Diseases* 53, 103-107.
20. REALPE ARANDA, M.I., G.A. TAFUR GOMEZ, M. DE BARROS, M.H. DOS SANTOS, L.L. DE OLIVEIRA, J.L. PENA, M.A. SCATAMBURLO MOREIRA (2019): Antimicrobial and synergistic activity of 2,2', 4 – trihydroxybenzophenone against bacterial pathogens of poultry. *Front. Microbiol.* 10, 490.
21. SID, H., S. HARTMANN, H. PETERSEN, M. RYLL, S. RAUTENSCHLEIN (2016): *Mycoplasma gallisepticum* modifies the pathogenesis of influenza A virus in the avian tracheal epithelium . *Int J Med Microbiol.* 306, 174-186.
22. SUN, S.K., X. LIN, F. CHEN, D.A. WANG, J.P. LU, J.P. QIN, T.R. LUO (2017): Epidemiological investigation of *Mycoplasma synoviae* in native chicken breeds in China. *BMC Vet. Res.* 12, 115.

23. WANG, C., F. ROBLES, S. RAMIREZ, A. BRINCH RIBER, A.M. BOJESEN (2016): Culture-independent identification and quantification of *Gallibacterium anatis* (*G.anatis*) by real-time quantitative PCR. Avian Pathology.

## 8. SAŽETAK

### **Dokaz i komparativna kvantifikacija sojeva *Gallibacterium anatis* i *Mycoplasma synoviae* iz obrisaka dušnika lakih i teških linija kokoši qPCR postupkom**

Silvia Buzaljko

*Mycoplasma synoviae* najčešći je preduvjet za izbijanje drugih bakterijskih bolesti pri čemu se sojevi *Gallibacterium anatis*, koja je komenzal gornjih dišnih prohoda peradi, lako šire u donje dijelove dišnog sustava ili kroz jajovod ascendentno do abdominalne šupljine. *M. synoviae* uzrokuje subkliničku zarazu gornjih dišnih puteva, a može biti i sistemna zaraza uz narušavanje kvalitete jaja. Počinje kao respiratorna infekcija što uzrokuje upalu zračnih vrećica i dovodi do širenja sekundarnih respiratornih patogena. *G. anatis* izaziva pad nesivosti i slabiju kvalitetu jaja, javljaju se depresija i proljev te se u kroničnim slučajevima razvija purulentni peritonitis. U predisponirajuće čimbenike za nastanak bolesti, osim infekcije drugim mikroorganizmima, spadaju i genetika, stres, hormonski i metabolički poremećaji te neprikladne zoohigijenski uvjeti. Predmet ovog istraživanja bio je utvrditi prevalenciju ovih patogena na pretraživanim farmama i međusobnu korelaciju njihovog broja. Cilj je bio istražiti mogući sinergizam *M.synoviae* i *G.anatis* u prevalenciji na farmama. Istraživanje je provedeno na šesnaest jata podrijetlom s osam različitih farmi. Uzročnici su dokazani i kvantificirani qPCR metodom zbog svoje osjetljivosti i specifičnosti. Ova metoda omogućava ranu detekciju bolesti koja je preduvjet za izradu adekvatnog programa profilakse. U pretraživanim uzorcima postoji statistički značajna korelacija u prevalenciji oba patogena na pojedinim farmama kao i prosječno značajno veće količine *G. anatis* u uzorku, ali nema korelacije s obzirom na njihov broj odnosno količinu na farmi. Rezultati ove studije ukazuju na to da su potrebna daljnja ispitivanja i praćenje spomenutih uzročnika kako bi se osiguralo zdravlje peradi te dobra proizvođačka praksa.

**Ključne riječi:** *Mycoplasma synoviae*, *Gallibacterium anatis*, qPCR, sinergizam, profilaksa

## 9. SUMMARY

### **Evidence and comparative quantification of *Gallibacterium anatis* and *Mycoplasma synoviae* strains from tracheal swabs of light and heavy chicken breeds using qPCR method**

Silvia Buzaljko

*Mycoplasma synoviae* is the most common prerequisite for other microbial outbreaks. In that case *G. anatis*, which is commensal of the upper respiratory tract in poultry, spreads easily to the lower parts of the respiratory tract or through the reproductive system to abdominal cavity. *M. synoviae* causes subclinical infection of the upper respiratory tract as well as systemic infection with lower egg shell quality. It starts as a respiratory infection which causes airsacculitis and leads to development of other secondary respiratory pathogens. *G. anatis* causes drop in egg production and leads to lower egg shell quality, depression and diarrhea. Moreover, in cases of chronic illness, purulent peritonitis is developed. Predisposing disease factors include genetics, stress, hormonal and metabolic disorders, unsuitable zoohygienic conditions along with infections caused by other microorganisms. The purpose of this study was to determine the correlation in prevalence of these two pathogens as well as mutual correlation of their quantity. The aim was to discover possible synergy between *M. synoviae* and *G. anatis*. Research has been done on sixteen flocks from eight different farms. The method of choice was qPCR because of its sensitivity and specificity. qPCR guaranty an early stage disease detection what is important for prophylaxis development. There was statistically significant correlation in analyzed samples regarding prevalence of both pathogens on the farms with significantly higher average levels of *G. anatis* compared to *M. synoviae*. However, there was no correlation regarding their number. Therefore, the results of this study indicate that further research and monitoring should be carried out in order to ensure good flock health and production practice.

**Key words:** *Mycoplasma synoviae*, *Gallibacterium anatis*, qPCR, synergy, prophylaxis

## **10. ŽIVOTOPIS**

Rođena sam 24. listopada 1995. godine u Zagrebu. Svoje obrazovanje započela sam u Osnovnoj školi Dragutina Tadijanovića 2002. godine te ga nastavila u Prirodoslovnoj školi Vladimira Preloga u sportskom razredu prirodoslovne gimnazije. Maturirala sam 2014. i upisala Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Od svoje sedme godine aktivno treniram karate i natječem se. Tijekom studija dva puta sam odrađivala ERASMUS+ stručnu praksu, prvi put u Portugalu, a drugi put u Španjolskoj. Područje mog interesa su laboratorijska istraživanja.