

Kontrola i prevencija zaraznog bronhitisa na farmama peradi

Husak, Hana

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:539256>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

Hana Husak

Kontrola i prevencija zaraznog bronhitisa na farmama peradi

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

ZAVOD ZA BOLESTI PERADI S KLINIKOM

Predstojnik: doc.dr.sc. Željko Gottstein

Mentor: doc.dr.sc. Željko Gottstein

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Doc. dr. sc. Maja Lukač
2. Izv. prof. dr. sc. Danijela Horvatek Tomić
3. Doc. dr. sc. Željko Gottstein

Zahvala

Zahvaljujem se mentoru doc. dr. sc. Željku Gottsteinu na ukazanom povjerenju, velikom strpljenju i stručnim savjetima koje mi je dao tijekom pisanja ovog rada.

Zahvaljujem se svima koji su mi davali podršku kroz sve ove duge godine studiranja – mojim roditeljima koji su uvijek bili uz mene i bili mi podrška, mojim prijateljima koji su mi bili moralna podrška, a pogotovo mom sinu Tinu koji je uvijek vjerovao u mene i bio strpljiv tijekom učenja za posljednje ispite.

Popis kratica

PCR – eng. polymerase chain reaction; lančana reakcija polimerazom

RFLP – eng. restriction fragment length polymorphism; polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata

VN – eng. virus neutralisation; virus neutralizacijski test

HI – eng. hemagglutination inhibition; inhibicija hemaglutinacije

TOC – eng. - tracheal organ culture; kultura organa dušnika

NK - eng. natural killer cells; prirodne stanice ubojice

BCR – eng. B cell receptor; površinski receptor B stanica

MHC – eng. major histocompatibility complex; glavni kompleks tkivne podudarnosti

APC – eng. antigen presenting cells; antigen-prezentirajuća stanica

TRC-eng. T cell receptor; površinski receptor T stanica

Th – eng. helper T lymphocytes; pomoćnički T- limfociti

Tc- eng. cytotoxic T lymphocytes; citotoksični T-limfociti

OAS – oligoadenilat- sintetaza

PKP – protein- kinaza R

Popis priloga

Slika 1. Pile sa dišnim simptomima

Preuzeto s www.infectious-bronchitis.com/sisns-lesions-ib.asph

Slika 2. Konjuktivitis uz periorbitalni edem i nosni iscjedak

Preuzeto s www.poultrydvm.com/condition/infectious-bronchitis;

[http:fieldcasestudy.com/](http://fieldcasestudy.com/)

Slika 3. Deformirana i depigmentirana jaja

Preuzeto s www.msdivetmanual.com/poultry/infectious-bronchitis

Slika 4. Upala zračnik vrećica kao rezultat sekundarne bakterijske infekcije

Preuzeto s www.thepoultrysite.com/publications/diseases-of-poultry/infectious-bronchitis-ib

Slika 5. Dušnik s prekomjernom količinom sluzi

Slika 6. Upalne stanice u sluznici respiratornog trakta

Slika 7. Nekroza bubrežnih tubula

Od 5.-7. preuzeto s www.msdivetmanual.com/poultry/infectious-bronchitis

SADRŽAJ

1.UVOD.....	6
2.ZARAZNI BRONHITIS.....	7
2.1.Povijesni podaci.....	8
2.2.Etiologija.....	8
2.3.Epizootiologija.....	10
2.4.Patogeneza.....	11
2.4.1.Osjetljivost domaćina.....	11
2.4.2.Dob i pasminska predispozicija.....	11
2.4.3.Receptori i ulaz virusa.....	12
2.4.4.Zaražavanje i prijenos.....	12
2.5.Klinička slika.....	12
2.6.Patomorfološke promjene.....	17
2.7.Dijagnoza.....	18
2.8.Liječenje.....	21
3.IMUNOPROFILAKSA.....	22
3.1.Imunosne stanice.....	22
3.2.Imunosni odgovor na zaražavanje patogenim mikroorganizmima.....	25
3.3.Cijepljenje.....	26
4.RASPRAVA.....	30
5.ZAKLJUČAK.....	31
6.LITERATURA.....	32
7.SAŽETAK.....	37
8.SUMMARY.....	38
9.ŽIVOTOPIS.....	39

1. UVOD

Zarazni bronhitis je proširen u cijelom svijetu i uzrokuje znatne gospodarske štete zbog velikog pomora pilića, pojave sindroma lažnih nesilica te pada nesivosti i kakvoće jaja. Smatra se da je zarazni bronhitis danas najčešće bolest tovnih pilića i konzumnih nesilica. Također, danas značajan problem predstavlja razlikovanje brojnih serotipova virusa.

Neke varijante mogu biti izvedene iz rekombinacije između postojećih divljih i cjepnih sojeva, dok su drugi rezultat mutacija divljih sojeva.

Postoji velik broj varijanti virusa zaraznog bronhitisa diljem svijeta, neki su jedinstveni za određeno područje, dok se drugi šire po cijelom svijetu.

Varijante od velike važnosti u većem dijelu svijeta, kao što su 4/91 ili QX šire se po Aziji, Europi i Africi, no nisu se pojavile u SAD-u ili Australiji (GELB,1997.). S druge strane, varijanta Arkansas se rijetko pojavljuje izvan SAD-a.

Iako je stroga biosigurnost jedna od bitnijih mjera kontrole, no cijepljenje je najvažniji alat za jačanje otpornosti pilića protiv sojeva zaraznog bronhitisa. Izbor cjepiva treba se zasnivati na prisutnim serotipovima u lokalnom području.

2. ZARAZNI BRONHITIS

Zarazni bronhitis kokoši je akutna, vrlo kontagiozna, ciklička virusna zaraza što se klinički očituje u tri oblika. Primarno je to zaraza dišnih puteva, ali može oštetiti reproduktivne organe i bubrege. Klinički simptomi variraju ovisno o dobi kokoši, patogenosti virusnog soja i razini imunosti.

U pilića i pilenki pomor može biti izrazito visok, a bolest je karakterizirana dišnim simptomima u obliku kataralnog traheitisa. Nefritis-nefroza sindrom se očituje blagim i prolaznim dišnim simptomima, općim infektivnim sindromom, te proljevom, naglim gubitkom težine i pojačanom potrošnjom vode. U odraslih kokoši dišni simptomi su slabi ili potpuno izostaju, ali dolazi do jakog pada nesivosti i kakvoće jaja.

Opisani sindromi se najčešće pogoršavaju i produljuju infekcijom s drugim uzročnicima, kao što su ptičji patogeni sojevi *Escherichia coli*, te vrstama *Mycoplasma synoviae* ili *Mycoplasma gallisepticum*.

Bolest je proširena u cijelom svijetu i uzrokuje znatne gospodarske štete zbog velikog pomora pilića, slabe nesivosti i kakvoće jaja.

U oporavljenih pilića povećava se potrošnja hrane, ali se smanji prirast i povećava količina konfiskata pri klaoničkoj obradi (BIĐIN, 2008.).

2.1. POVIJESNI PODACI

Zarazni bronhitis je prvi put opisan 1930. u SAD-u , ali nije ustanovljeno da je uzročnik bolesti virus (SCHALK i HAWN, 1930.). Studije koje su proveli BUCNELL i BRANDI (1932.) ustanovile su da bolest uzrokuje filtrabilni uzročnik, najvjerojatnije virus.

Virus je prvi put izdvojen 1937. godine.

Bolest se uvelike proširila na farmama raznih država, a od 1950. virus zaraznog bronhitisa je stigao u gotovo sve zemlje s razvijenim peradarstvom: Norvešku, Dansku, Italiju, Belgiju, Argentinu, Brazil, Indiju, Švedsku, Poljsku, Španjolsku, Rumunjsku, Grčku, Nizozemsku, Švicarsku, Egipat (JUNGHERR, 1956.).

Zaraza je unesena u SSSR s uvezenim pilićima 1955., a prva zabilježena zaraza na velikim intenzivnim farmama opisana je 1968. godine.

Serološke razlike između sojeva virusa ustanovljene su 1957., a u početku su se razlikovala samo dva tipa: prvi je bio Massachusetts, a drugi Connecticut.

U Hrvatskoj je bolest dokazana 1961. godine (MAZIJA i sur., 1969.)

2.2. ETIOLOGIJA

Virus zaraznog bronhitisa svrstan je u porodicu Coronaviridae, rod *Gammacoronavirus*, red *Nidovirales*. On je ujedno i prvi koronavirus kome je sekvencioniran genom. (BANDE i sur., 2015.). Koronavirusi su nesegmentirani RNA virusi veličine od 67-200 nm, okruglog do elipsoidnog oblika, a vanjski izgled mu određuje zaštitna ovojnica s izdancima u obliku krune.

Dvostruka lipidna ovojnica okružuje nukleokapsidu virusne čestice pa ju čini osjetljivom na organska otapala kao što je kloroform.

Dva glikolizirana proteina- veliki multimerni protein izdanaka (S) i membranski protein (M) spojeni su u membrani virusne ovojnice što obavlja helikalnu nukleokapsidu koja sadrži RNK genom (STURMAN i HOLMES, 1983.).

Strukturni proteini su glikoproteinski izdanak (S), ovojnica (E), membranski protein (M) i nukleokapsida (N). Ovi proteini zajedno imaju ulogu kod prihvata virusa, replikacije i izazivanja kliničke bolesti (BANDE i ARSHAD, 2015.).

Monomeri što čine S protein posttranslacijski su pocijepani na S1 (odgovoran za tvorbu neutralizacijskih i heminhibicijskih protutijela) i S2 (pridružen membrani).

Sojevi zaraznog bronhitisa razlikuju se virus neutralizacijskim testom, inhibicijom hemaglutinacije i na kulturi organa dušnika.

U svijetu je poznato oko 30 serotipova, dok je samo u SAD-u poznato više od 16.

Tijekom umnažanja virusa mogu nastati serološke varijante i genomske razlike kao rezultat rekombinacije između genetski različitih sojeva, ali i mutacija tipičnih za RNK viruse (GELB i CAVANAGH, 2008.).

Tako se na osnovi antigenskih svojstava membranskih proteina mogu povezati sojevi različitih seroloških skupina.

Varijacije virusa zaraznog bronhitisa u prirodi se mogu istražiti određivanjem razlika u homolognosti sekvencija S1 proteina analizom sekvencija genoma.

Velik broj tipiziranih sojeva zaraznog bronhitisa razlikuje se u virulenciji ili patogenosti za dišni trakt, bubrege ili jajovod.

Tako će većina sojeva, uključujući serotip Massachusetts soj M41, uzrokovati dišne simptome s upalom zračnih vrećica i perikarditisom. Također, sojevi se razlikuju i u patogenosti za jajovod pa će se mnogi umnažati u njemu i stvarati patološke promjene, a većina će i nepovoljno utjecati na nesivost i kvalitetu jaja.

Virus zaraznog bronhitisa u okolini preživi oko 7 dana, najduže 30 dana, a u vodi za piće oko 11 sati. Najveći broj sojeva zaraznog bronhitisa inaktivira temperatura od oko 56 °C tokom 10 minuta, a samo neki sojevi prežive 30 minuta.

Virus je osjetljiv na dezinficijense, 6%-tni formalin, fenol i 2%-tni natrij hidroksid inaktiviraju ga za vrlo kratko vrijeme (OTSUKI i YAMAMOTO, 1979.). Ultraljubičasto i infracrveno zračenje može brzo inaktivirati virus. Opsežna istraživanja u veterinarskoj medicini dovela su do mnogih spoznaja o životinjskim koronavirusima, njihovoj evoluciji i patologiji. Istraživanja virusa zaraznog bronhitisa peradi pokazala su da koronavirusi mogu mijenjati svoj tropizam prema određenom tkivu i svoju virulenciju te da mogu prevladati vrsnu barijeru i zaraziti novog domaćina. Virus je podložan čestim genetskim promjenama u smislu nakupljanja točkastih mutacija te homolognih i heterolognih rekombinacija. Njihova genetička varijabilnost

rezultira kontinuiranom pojavom novih sojeva s povećanom virulencijom, različitim tropizmom i širenjem uzročnika na novog domaćina.

2.3. EPIZOOTIOLOGIJA

Zarazni bronhitis karakterizira vrlo brzo širenje, a širi se uobičajenim lancem bez posrednika.

Iz bolesne životinje virus se izlučuje oko 35 dana, iako se podaci o tome koliko su bili nosioci razlikuju - prema nekim izvještajima čitav život, prema drugima nekoliko mjeseci. Primarno obole kokoši svih dobnih skupina.

Sve do nedavno vjerovalo se da je kokoš jedini osjetljivi prirodni domaćin zaraznog bronhitisa, ali je dokazano da su farmски uzgajani fazani jednako osjetljivi kao i kokoši. Protutijela su dokazana i u purana, ali jos nije poznato može li se iz njih izdvojiti virus.

U fazana se bolest očituje intersticijskim nefritisom, smanjenom nesivošću i visokim pomorom.

Primjenom RT-PCR metode potvrđen je koronavirus u fazana i to uobičajeno kod onih sa dišnim simptomima.

Na osnovi nalaza genskih sekvenci virusa značajno je visok stupanj sličnosti između koronavirusa kokoši, purana i fazana (CAVANAGH, 2002.).

Zaraza se prenosi na različite načine:

- preko iscjetka iz nosa bolesnih pilića, sline i izmeta
- aerogeno
- kontaminiranom hranom i vodom
- putem zaraženih jaja
- preko kontaminirane opreme na farmi

Sljedeći čimbenici uvelike doprinose širenju virusa zaraznog bronhitisa:

- kršenje veterinarskih i sanitarnih mjera tijekom leženja jaja i pilića
- prenapučenosti životinja u objektima

- nepravilno hranjenje – velika količina proteina u hrani
- stres

Svi ti čimbenici oslabljuju imunitet ptica i čine ih podložnima bolesti.

Još u inkubaciji virus se nalazi u sluznici dušnika i plućima što će uzrokovati kašalj i kihanje. Na taj se način virus obilno prenosi u okoliš pa se aerogeno brzo proširi u cijelo jato, a uz to se širi i kontaminiranom hranom, vodom i priborom.

U domaćina virus ulazi preko sluznice prednjih dišnih puteva, u kloaci je poslije pokusnog zaražavanja dokazan za 3 do 24 dana, a u zaraženoj kokoši se zadrži 4 do 5 tjedana (DAVELAAR, 1984.).

Virus zimi u peradnjaku preživi oko 56 dana, a u proljeće oko 12 dana.

Cijelo jato može oboljeti unutar 36 sati i zato je pored izravnog, neizravno širenje epizootiološki vrlo značajno.

2.4. PATOGENEZA

Virus zaraznog bronhitisa primarno zahvaća respiratorni sustav. Međutim, neke varijante i nekoliko izolata zahvaća reproduktivni i probavni sustav, te bubrege pilića.

Patogeneza bolesti razlikuje se ovisno o zahvaćenom sustavu i soju virusa.

2.4.1. Osjetljivost domaćina

Iako se domaća perad i fazani smatraju prirodnim domaćinima virusa zaraznog bronhitisa, ostali virusu zaraznog bronhitisa slični koronavirusi identificirani su u pauna, purana, golubova, gusaka, pataka, pingvina i Amazonske papige.

Antitijela zaraznog bronhitisa nađena su u ljudi koji su u bliskom kontaktu s peradi, ali nije zabilježeno da je virus uzrokovao kliničku bolest kod ljudi (MILLER i YATES, 1968.).

2.4.2. Dob i pasminska predispozicija

Kokoši svih dobi i pasmina su osjetljive na zarazu virusom zaraznog bronhitisa, ali je težina i proširenost bolesti veća u pilića u usporedbi s odraslim jedinkama. Slično tome, otpornost prema infekciji raste s povećanjem dobi (CRINION i HOFSTAD, 1972.).

Eksperimentalni dokazi pokazuju da su linije C bijelih Leghorn pilića otporniji u usporedbi sa linijom 151 (BACON i HUNTER, 2004.).

2.2.3. Receptori i ulaz virusa

Glavnu ulogu za prihvat virusa za stanicu domaćina ima S1 glikoproteinski izdanak. Varijacije u S1 glikoproteinu određuju tkivni tropizam i virulenciju. (CAVANAGH, 2003.).

Virus zaraznog bronhitisa zahvaća dušnik, bubrege i reproduktivni trakt. Virus ulazi u stanicu i otpušta svoju nukleokapsidu u citoplazmu stanice aktivirajući tako replikaciju.

2.4.4. Zaražavanje i prijenos

Virus se prenosi respiratornim sekretima i fecesom zaražene peradi. Kontaminirani objekti i oprema mogu pomoći prijenosu šireći virus iz jednog stada u drugo.

Virus je pronađen u dušniku, bubregu i Fabricijevoj burzi 24 sata nakon aerogenog prijenosa. Nekoliko sojeva izolirano je i iz obriska kloake, izmeta i cekumskih tonzila, te iz jednjaka, proventrikula, duodenuma i jejunuma. Virus zaraznog bronhitisa u tim se tkivima vjerojatno umnaža u epitelnim stanicama, dok se u donjim dijelovima crijeva umnaža i u histiocitima i limfoidnim stanicama i u epitelnim stanicama resica ileuma i rektuma.

Varijantni soj G klasificiran je kao enterotropni serotip temeljem produženog zadržavanja u crijevu u odnosu na dušnik.

Za soj 793/B izdvojen iz roditeljskih pilića dokazano je da je uzrokovao obostranu mioopatiju dubokih i površinskih prsnih mišića. Mišići su bili otečeni i blijedi s povremenim krvarenjem u fascijama i slojem želatinoznog edema po površini (DHINAKAR i JONES 1997.).

2.5. KLINIČKA SLIKA

Zarazni se bronhitis klinički očituje kao dišna bolest, reproduksijska bolest ili kao virusni nefritis.

Klinička bolest uglavnom traje 1 do 2 tjedna, a pomor obično nastaje u pilića dobi do 6 tjedana.

Pilenke zaražene u dobi do 14 dana, poslije preboljenja se mogu razviti u tzv. lažne nesilice zbog oštećenja jajovoda (BIÐIN, 2008.).

Dišna se bolest očituje kao akutni (zloćudni) oblik pretežito kao bolest prednjih dišnih prohoda ili kao blagi (dobročudni) oblik.

Bolesni pilići dobi od 2 do 6 tjedana otežano dišu na otvoren kljun (Slika 1.), kišu, kašlju, a često se čuju i hropci, oči i nosni otvori su vlažni, a sinusi otečeni, perje je neuredno i nakostriješeno. Ponekad se može javiti i oticanje na glavi, te periorbitalni edem (Slika 2.).

Klinički znakovi uključuju i opći infekcijski sindrom: životinje su potištene, okupljaju se oko izvora topline, manje jedu i piju gube na težini. Ne nastanu li komplikacije, klinički simptomi obično traju oko 7 dana.

Sekundarne infekcije su česte, najčešće uzrokovane s ptičjim patogenim sojevima bakterije *Escherichia coli*, *Mycoplasma synoviae* ili *Mycoplasma gallisepticum*, pa dišna bolest može potrajati i nekoliko tjedana s velikim pomorom.

U uobičajenim okolnostima, bez komplikacija bolesti sa sekundarnim infekcijama, uginuće nastupi za 7 do 14 dana (pomor može biti i do 80 %). Preživjeli pilići se oporave za 10-ak dana.

Za razliku od tovnih pilića, bolest se kod pilenki starijih od 6 tjedana javlja u blažem obliku, a očituje se kratkotrajnim, blagim dišnim simptomima kao što su otežano disanje, blag kašalj i hropci.

U nesilica zaraza virusom zaraznog bronhitisa uzrokuje reproduksijske probleme, dok su dišni simptomi vrlo blagi (šmrcaje, kašljanje, vlažni hropci) ili mogu u potpunosti izostati. Kod nesilica se javlja znatan pad nesivosti, a težina pada ovisi o dobi nesilice (najizraženiji je u starijih kokoši i oporavak traje duže) i soju virusa što je uzrokovao bolest.

Infekcija reproduktivnog trakta uzrokuje lezije na jajovodu, što dovodi do pada nesivosti i smanjene kvalitete jaja. Zabilježen je pad nesivosti i do 50 %. (CAVANAGH, 2007.),

U nekih jata se zamjećuje samo pad nesivosti i nešto manja potrošnja hrane, dok su u drugih jata jaja sitna, slabije kvalitete, deformiranog oblika, žumanjak je vodenast sa znatim primjesama, a ljuska naborana ili krhka. Ljuska može biti boje bijele kave, ili se u jaja smeđe ljuske potpuno izgubi pigment (Slika 3.).

Nefritički oblik zaraznog bronhitisa najčešći je u tovnih pasmina, a karakteriziraju ga vrlo blagi i prolazni dišni simptomi koje prati potištenost, nakostriješeno perje, nevoljko kretanje, pogrbljenost, proljev i nagli gubitak tjelesne mase i pojačana potrošnja vode.

Nefropatogeni sojevi mogu izazvati intersticijski nefritis sa visokom smrtnošću (do 60 %).

U većini slučajeva proizvodnja jaja i njihova kvaliteta se vraćaju u normalu, ali to može potrajati i do 8 tjedana.

Infekcija mladih pilenki može izazvati trajna oštećenja jajovoda, što za posljedicu ima jedinke ili jata koja nikad ne dosegnu normalnu razinu proizvodnje.



Slika 1. Pile sa dišnim simptomima

izvor: www.infectious-bronchitis.com/sinus-lesion-ib.asph



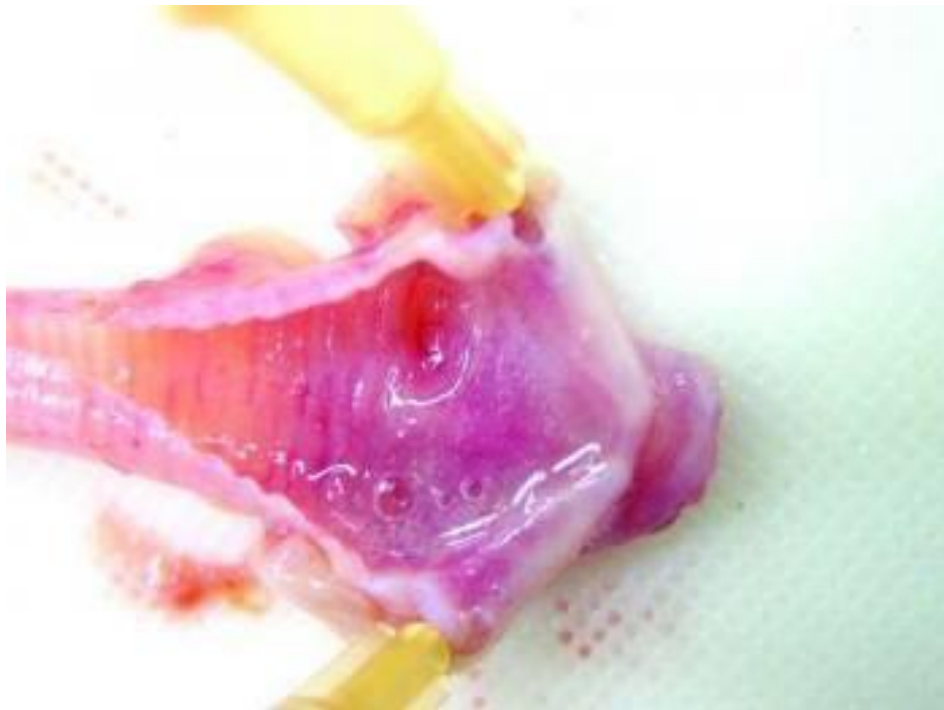
Slika 2. Konjunktivitis uz periorbitalni edem i nosni iscjedak
izvor: www.poultrydvm.com/condition/infectious-bronchitis



Slika 3. Deformirana i depigmentirana jaja
izvor: www.msdivetmanual.com/poultry/infectious-bronchitis



Slika 4. Upala zračnih vrećica kao rezultat sekundarnih bakterijskih infekcija
izvor: www.thepoultrysite.com/publications/disease-of-poultry/infectious-bronchitis-ib



Slika 5. Dušnik s prekomjernom količinom sluzi
izvor: www.msdsvetmanual.com/poultry/infectious-bronchitis

2.6. PATOMORFOLOŠKE PROMJENE

U dušniku i sinusima pilića i pilenki stvara se serozni, kataralni ili kazeozni eksudat. Zračne vrećice su zamućene (Slika 4.), pluća su kongestirana, a sluznica dušnika i bronha može biti hemoragično ili kazeozno upaljena (Slika 5.).

Kada je zahvaćen reproduktivni sustav jajnik je degeneriran i atrofičan i na njemu se mogu naći ciste, javljaju se lezije na jajovodu, a u torakoabdominalnoj šupljini se može naći tekući žumanjak.

U pilića s nefritisom mišići trupa su dehidrirani i tamni, bubrezi su povećani, a tubuli i ureteri ispunjeni uratima.

Infekcija s nefropatogenim virusom zaraznog bronhitisa može dovesti do otečenih, blijedih i prošaranih bubrega.

Histološki, u akutnom tijeku bolesti epitel sluznice dušnika je hiperemičan, nastaje edem i dolazi dio infiltracije limfocita (Slika 6.).

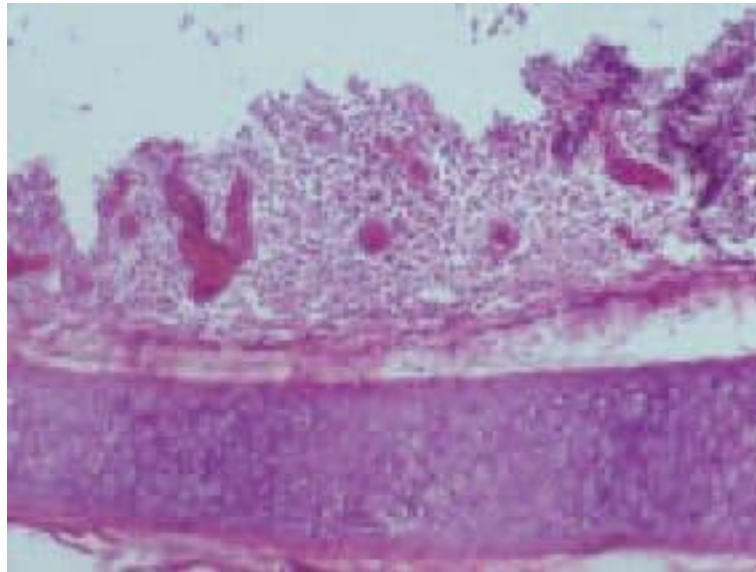
U fazi reparacije edem je prožet staničnim infiltratom, a u takozvanoj imunoj fazi počinje obnova sluznice.

Respiratorni oblik bolesti karakterizira nestanak trepetljika na epitelu dušnika.

U sluznici jajovoda nesilica cilindrični epitel je spljošten i stanice postaju kuboidne, nestaju trepetljike na epitelu jajovoda, tubularne žlijezde su proširene.

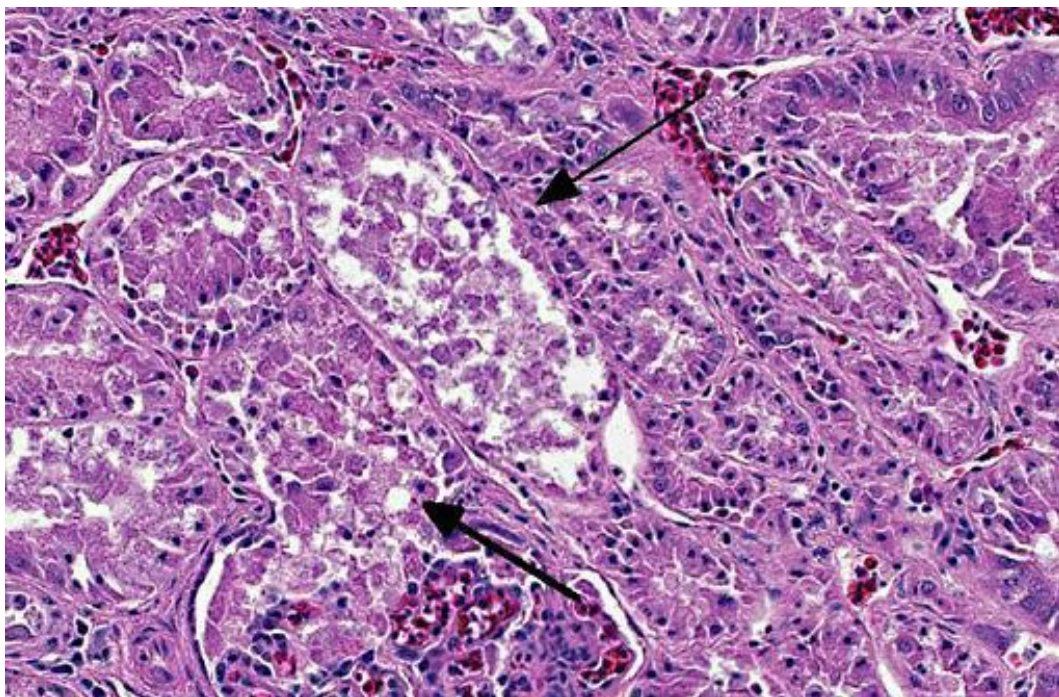
Nefropatogeni sojevi prvo uzrokuju nestanak cilija u dušniku, zatim se javlja hiperplazija sluznica, u submukozi je prisutan edem i infiltracija limfocita.

Bubrezi su oštećeni i sadrže urate, dolazi do intersticijskog nefritisa, degeneracije tubula i infiltracije heterofilima (Slika 7.).



Slika 6. Upalne stanice u sluznici dušnika

izvor: www.msdtvetmanual.com/poultry/infectious-bronchitis



Slika 7. Nekroza bubrežnih tubula

izvor: www.msdtvetmanual.com/poultry/infectious-bronchitis

2.7.DIJAGNOZA

Dijagnoza zaraznog bronhitisa komplicirana je činjenicom da slični klinički znakovi

moгу biti manifestacija razliĉitih bolesti: boginja, newcastleske bolesti, zaraznog laringotraheitisa i mikoplazmoze. Stoga se virus prvo mora izolirati, identificirati i tipizirati.

Da bi se postavila toĉna dijagnoza, potrebno je obaviti niz laboratorijskih ispitivanja. Najmanje 5 bolesnih pilića i uzoraka seruma krvi iz bolesnih ptica treba poslati u laboratorij na analizu. Dijagnostika zaraznog bronhitisa provodi se razliĉitim metodama. Izbor metode ovisi o vrsti uzorka, dostupnosti ispitivanog materijala, svrsi ispitivanja i da li se provodi na terenu ili laboratoriju.

U prošlosti su se serološka ispitivanja kao što su virus neutralizacijski test (VN) i inhibicija hemaglutinacije (HI) koristila ĉesto za otkrivanje i serotipizaciju sojeva virusa zaraznog bronhitisa (CAVANAGH, 1992.). Ovi testovi su se takoĊer koristili za procjenu zaštite jata nakon cijepljenja. Protutijela specifiĉna za odreĊeni serotip uobiĉajeno se otkrivaju pomoću IH testa, iako je IH test manje pouzdan.

S druge strane ELISA je osjetljivija i lako se upotrebljava na terenu i za praćenje imunosnog odgovora - protutijela nakon cijepljenja ili izlaganja virusu. Imunofluorescencijom se bolest moţe dokazati u akutnoj fazi (prvih 7 do 10 dana). TakoĊer, nakon izdvajanja, virus zaraznog bronhitisa potrebno je tipizirati. Izolacija virusa je takozvani zlatni standard u dijagnostici zaraznog bronhitisa. Uzimanje uzoraka u ranoj fazi bolesti i uz pravu tehniku uzorkovanja su ključni za uspješnu izolaciju virusa.

Za uspješnu izolaciju virusa iz obriska preporuĉljivo je uzorak spremiti u transportni medij tijekom dostave u laboratorij.

Ako se uzimaju uzorci tkiva, preporuĉljivo je uzimati uzorke tkiva dušnika, proventrikula, bubrega, cekumskih tonzila i jajovoda. Uzorci tkiva se uzimaju u aseptiĉkim uvjetima neposredno nakon uginuća, spremaju se u sterilne, dobro zatvorene plastiĉne vrećice za uzorke i transportiraju na ledu u laboratorij na daljnju obradu.

Virus zaraznog bronhitisa dobro se umnaţa u kokošjem zametku. Za inokulaciju se koristi amnionska ili alantoisna vrećica zametka dobi od 9 – 11 dana. Obrisci kliniĉkih uzoraka dušnik ili homogenizirano tkivo se inokulira u alantoisnu vrećicu SPF jaja i inkubira na temperaturi 37°C nakon inokulacije. Jaja se prosvjetljuju dnevno kako bi se provjerilo preţivljavanje zametaka. Nakon 48-72 sata od inokulacije alantoisna tekućina se testira na prisutnost virusa zaraznog bronhitisa koristeći se serološkim testovima ili RT-PCR metodom. Ponekad se alantoisna tekućina mora podvrgnuti uzastopnim pasaţama kako bi se virus

prilagodio i replicirao do višeg titra. Nakon 5-7 dana inokulirani zameci se otvore i pretražuju na lezije karakteristične za virus zaraznog bronhitisa kao što su zakrivljenost i kržljivost zaraženog zametka.

Za umnažanje se osim zametaka koriste i stanične kulture kao što su bubrezi kokošnjih zametaka, fibroblasti i Vero stanice. Veliki nedostatak ove metode u izolaciji virusa je što se svi sojevi virusa zaraznog bronhitisa lako ne prilagođavaju kulturi stanica. Rast virusa uvijek zahtijeva primarnu izolaciju na zamecima i nekoliko pasaža prije prilagodbe. Kulture organa se također mogu koristiti za izolaciju virusa. Kultura organa dušnika (TOC) je pripremljena od prstena dušnika kokošnjih zametaka inkubiranih 20 dana.

Prsteni dušnika se stavljaju u valjkastu bočicu i inokuliraju uzorcima sumnjivim na virus zaraznog bronhitisa. Kulture se promatraju mikroskopski na dokaz ciliostaze (mjeri se cilijarna aktivnost dušnika) pod svjetlosnim mikroskopom. Ukoliko se dokaže potpuni prestanak cilijarne aktivnosti kultura se smatra pozitivnom..

Elektronskim mikroskopom omogućuje se izravno otkrivanje i identifikaciju virusa zaraznog bronhitisa u biološkim uzorcima na temelju morfoloških karakteristika koronavirusa. Pozitivne kulture su potvrđene na temelju prisutnosti koronavirus pleomorfnih struktura šiljaste projekcije.

Imunoperoksidaza i imunofluorescencija su dvije histokemijske metode za otkrivanje i potvrdu antigena virusa zaraznog bronhitisa u zaraženom tkivu ili stanici. Ova metoda je bazirana na reakciji antigen-protutijelo. Metoda imunoperoksidaze kao što je avidin-biotin kompleks koristi se za uspješno lokaliziranje antigena virusa zaraznog bronhitisa u uzorcima tkiva. Također, i indirektna imunofluorescencija je najčešće upotrebljavana od fluorescentnih metoda.

Molekularne metode kao što su RT-PCR, RealTime PCR, RFLP i sekvencioniranje genoma su zamijenile konvencionalne serološke metode dijagnoze zaraznog bronhitisa i koriste se u dokazu i tipizaciji virusa (ADZHAR i SHAW,1996.). RT-PCR koristi virusnu RNA amplificiranu direktno (one-step RT-PCR) ili nakon cDNA sintezu (two-step RT-PCR). RT-PCR ispitivanje je napravljeno i predstavljeno 1991. za otkrivanje S2 gena virusnog bronhitisa. Naknadno je općeniti i serotip specifični RT-PCR napravljen kako bi ciljao različite fragmente u virusnom genomu zaraznog bronhitisa. RT-PCR baziran na N-genu koristi se za univerzalno otkrivanje ciljnog područja u mnogim serotipovima virusa. Amplifikacija i sekvencioniranje S1 gena se koristi za genotipsku klasifikaciju novih sojeva virusa zaraznog bronhitisa.

Serotipno specifičan PCR je napravljen kako bi omogućio diferencijaciju Massachusetts, Connecticut, Arkansas i Delaware izolata. RFLP je metoda koja diferencira različite poznate sojeve virusa i identificira nove varijante prateći RT-PCR amplifikaciju i enzimsku analizu. Ispitivanje je napravljeno kako bi se usporedilo s tradicionalnim virus neutralizacijskim testom. Real - Time RT-PCR predstavlja ispitivanje koje povećava osjetljivost i specifičnost za otkrivanje virusa zaraznog bronhitisa. Uz dokaz virusa, moguće je virus i kvantificirati u tkivu ili uzorku. Diferencijacija Massachusetts od ne-Massachusetts soja je moguća pomoću Real-Time PCR metode ciljanjem glikoproteina S1 gena. Drugi oblici PCR metoda se također koriste u otkrivanju virusa zaraznog bronhitisa kao što su nested PCR, multiplex PCR i reverzna transkripcija LAMP. Ove metode su osjetljivije od standardnog RT-PCR.

2.8. LIJEČENJE

Bolest se ne liječi, no iznimno se mogu liječiti sekundarne bakterijske infekcije. Na farmama u kojima je došlo do izbijanja bolesti valja poboljšati opće uvjete držanja: uklanjanje propuha u prostorijama za držanje peradi, osigurati optimalnu temperaturu okoliša, pripaziti na vlažnost zraka, dodavati mikroelemente i vitamine u vodu i hranu, redovito vršiti dezinfekciju prostora (dva puta tjedno u prisutnosti pilića s 2%-tnim natrij- kloridom).

Idealan management uključuje striktno izolaciju, visoku biosigurnost praćenu dezinfekcijom peradnjaka i opreme koja je bila u kontaktu s peradi ili steljom, te kompostiranje ili uklanjanje fecesa.

Zbog visoke zaraznosti virusa, imunizacija je potrebna u mnogim područjima kako bi se spriječili gubici u industriji.

3. IMUNOPROFILAKSA

3.1. IMUNOSNE STANICE

Stanice urođene imunosti

Prirodno ubilačke (eng. natural killer, NK) stanice, makrofagi i heterofili su stanice nespecifičnog djelovanja koje sudjeluju u urođenom i stečenom imunom odgovoru (KAISER, 2010.; SHARMA i RAUTENSCHLEIN, 2013.).

Na svojoj površini ili u citoplazmi imaju receptore kojima prepoznaju specifične evolucijski očuvane molekularne obrasce svojstvene patogenima, poput nukleinskih kiselina i glikoproteina virusa (KAISER, 2010.).

NK stanice su ne-limfoidne, ne-makrofagne citolitičke stanice koje sudjeluju u lizi virusom zaraženih i tumorskih stanica. Prisutne su u slezeni, perifernom krvotoku, timusu, burzi i crijevnom epitelu.

Makrofagi pripadaju populaciji stanica mononuklearnog fagocitnog sustava. U ptica također razlikujemo pokretne (monociti u krvi) i sesilne tkivne (Kupferove stanice jetre, epitelne stanice seroza, mikroglija u CNS-u, histiociti, epiteloidne i divovske stanice) makrofage. Makrofagi su tkivni oblik krvnih monocita koji započinju diferencijaciju u koštanoj srži (QURESHI i sur., 2000.).

Heterofili su polimorfonuklearni granulociti ptica koji se smatraju ekvivalentima neutrofilima sisavaca jer vrlo učinkovito fagocitiraju strane tvari i uklanjaju prvenstveno bakterije. Poslije eritrocita, druge su najbrojnije stanice u krvi ptica (MAXWELL i ROBERTSON, 1998.). Heterofili su izvršne stanice humoralnog imunog odgovora i čini se glavne izvršne stanice u okviru reakcije stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelima i prirodne citotoksičnosti (SHARMA i RAUTENSCHLEIN, 2013.). Brzo odgovaraju na kemotoksične podražaje i često su prve stanice koje se nađu na mjestu upale. Međutim, oni nakon fagocitoze bakterija i oštećenih stanica ne pripremaju niti predočavaju antigene stanicama stečenog imunog odgovora.

Bazofili se rijetko nađu u krvi ptica. Prema GERLACH (1994.) su istovjetni vezivnotkivnim mastocitima i potiču upalnu reakciju oslobađanjem vezivnotkivnih amina, proteina, prostaglandina i čimbenika koagulacije iz svojih granula.

Eozinofilni leukociti u sisavaca imaju važnu ulogu u nametničkim invazijama i u reakcijama preosjetljivosti, no čini se da u ptica nema funkcionalnih eozinofila (KAISER, 2010.).

Stanice stečene imunosti

B limfociti potječu iz limfoidnih folikula Fabricijeve burze gdje hematopoetske matične stanice prolaze proces konverzije gena kojim nastaju brojne stanice-kćeri, svaka sposobna prepoznati njoj svojstveni antigen putem površinskih imunoglobulinskih receptora (eng. B cell receptor, BCR). B limfociti nakon prepoznavanja antigena i uz pomoć T limfocita sazrijevaju, proliferiraju i diferenciraju u konačne izvršne oblike, plazma stanice ili memorijske stanice.

Protutijela su osnovne funkcionalne jedinice humoralne imunosti. Njih izlučuju izvršni oblici B limfocita, odnosno plazma stanica. Kao površinske molekule na B limfocitima su imunoglobulini kao receptori za antigen, a kao topivi oblik nakon sekrecije nalazimo ih kao slobodna humoralna protutijela u tjelesnim tekućinama i krvi. U ptica su dokazana tri razreda ili izotipa imunoglobulina - IgA, IgY i IgM.

IgM se prvi izlučuju nakon cijepljenja, nalazimo ih u serumu, a funkcija im je vezati i aktivirati sustav komplementa. IgY protutijela analogna su IgG protutijelima sisavaca, a izlučuju se nakon sinteze IgM. Nalazimo ih u serumu i u žumanjku jajeta kao materalna protutijela. Sudjeluju u memorijskom odgovoru vežući antigen, aktivirajući fagocite i sustav komplementa. IgA protutijela se konstantno sintetiziraju, najviše na površini sluznica odakle se izlučuju u krv, žuč, slinu, suze i sluz. Zaslužni su za imunost sluznica tako što neutraliziraju viruse i mikrobne toksine, te sprečavaju prijanjanje i kolonizaciju patogenih mikroorganizama (SHARMA i RAUTENSCHLEIN, 2013.).

Kokošji T-limfociti su biološki i fenotipski heterogena populacija limfocita. Kao antigen-specifične stanice uključene su u stanični imunosni odgovor i sposobne su prepoznati široki raspon patogena prepoznavanjem epitopa predodčenih u okviru glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (eng. major histocompatibility complex, MHC) na antigen-prezentirajućoj stanici (eng. antigen presenting cells, APC).

Brojne subpopulacije T limfocita su identificirane u kokoši. Svaka od subpopulacije ističe jedinstvene stanične površinske antigene (biljege) koji se mogu identificirati primjenom monoklonskih protutijela (ERF i sur.,1998.; BALENOVIĆ i sur., 2007.).

Svi T-limfociti ptica izražavaju površinski T stanični receptor (eng. T cell receptor, TCR) kojim prepoznaju antigene epitope u okviru MHC na APC stanicama. Kao i TCR sisavaca, TCR ptica se pojavljuje u dva tipa. Oba tipa TCR-a su transmembranski heterodimeri koje čine dva polipeptidna lanca. Ovisno o izražaju polipeptidnih biljega, CD4 i CD8, T-limfociti se mogu grupirati u dvije funkcionalne podskupine. CD4 molekulu izražavaju pomoćnički T limfociti (eng. helper T lymphocytes, Th), za razliku od CD8 koja je površinski stanični biljeg za citotoksične T-limfocite (eng. cytotoxic T lymphocytes, Tc). Postoje značajne razlike između vrsta ptica, ali i MHC halotipova kokoši u udjelu cirkulirajućih Tc i Th limfocita, a s tim u svezi je i otpornost, odnosno prijemljivost za određene bolesti (DALGAARD i sur., 2010.).

Citokini

Citokini su male, biološki aktivne molekule, najčešće bjelancevine, koje izlučuju brojne stanice. Imaju brojne funkcije, a jedna od njih je kontrola i koordinacija međudjelovanja imunskih stanica tijekom imunskog odgovora, ali i njihova diferencijacije i homeostaze. (KAISER, 2010.). Također su i ključni stimulatori početka i održavanja imunskog odgovora, te igraju ulogu izvršnih molekula koje utječu na njegovo trajanje i jačinu (WIGLEY i KAISER, 2003.). Citokini se vežu na specifične receptore na ciljnoj stanici i usmjeravaju imunski odgovor prijenosom signala među stanicama.

Citokini koje izlučuju Th limfociti imaju ključnu ulogu u oblikovanju imunskog odgovora. Geni koji kodiraju za većinu glavnih ptičjih citokina i njihovih receptora uspješno su klonirani i sekvencionirani, a dostupni su i brojni rekombinantni citokini za primjenu u terapiji te kao adjuvansi u cjepivima.

Interferon

Važnu ulogu u imunskoj reakciji na virusne antigene imaju interferoni (IFN) koji pored antivirusnog djelovanja posreduju i među stanicama tijekom imunske reakcije. Dijele se na IFN tip I i IFN tip II.

IFN tip I luče sve stanice s jezgrom. Ima dominantni antivirusni učinak i pojačava ispoljavanje MHC I molekula (WIGLEY i KAISER, 2003.). Aktivira niz antivirusnih mehanizama poput enzima oligoadenilat sintetaze (OAS), koja aktivira endonukleaze koje razgrade virusni genom, proteinkinazu R (PKR) koja inhibira virusnu transkripciju i translaciju te citoplazmatske Mx proteine, koji također djeluju antivirusno. Potiče ispoljavanje MHC I

molekula u sklopu kojih ispoljeni virusni antigeni označavaju virusom zaraženu stanicu i pretvaraju je u metu za T_c limfocite.

INF tip II kao takozvani imunosni interferon ima važnu ulogu u aktivaciji makrofaga i modulaciji imunosne reakcije uz antivirusnu aktivnost. Primarno ga proizvode T limfociti i NK stanice čime dovode do antimikrobne aktivacije makrofaga, potičući obradu antigena i ispoljavanje MHC II u makrofagima i drugim stanicama.

3.2. Imunosni odgovor na zaražavanje patogenim mikroorganizmima

Imunosni odgovor na infekciju nastupa nakon prodora patogena u organizam i uključuje složeno međudjelovanje između različitih populacija i subpopulacija imunosnih stanica, usklađenih djelovanjem različitih topljivih molekula (citokina). Imunokompetentan organizam na dodir s antigenom odgovara fagocitima, T i B limfocitima i NK stanicama.

Na ulaznim vratima aktiviraju se mehanizmi urođene imunosti, prije svega fagocitoza i citolitičko uništavanje zaraženih stanica (NK stanice).

Pri fagocitozi patogena ili strane tvari antigeni se razgrade u manje peptide (antigenske determinante ili epitopi) unutar proteolitičkog kompleksa, tzv. proteosoma. Mali peptidi se nakon toga prenose do endoplazmatskog retikuluma gdje se vežu na MHC I. Kompleks peptid-MHC I se prenosi na površinu stanice u cilju prepoznavanja od strane antigen specifičnih T limfocita. NK stanice prepoznaju stanice izmijenjenih karakteristika stanične površine kao „ne-svojevne“ tj. tuđe i uništavaju ih (KAISER, 2010.).

Nakon prezentacije antigena od strane APC i njegova vezanja za receptore na T i B limfocitima, pokreću se transmembranski signali koji posljedično dovode do njihove proliferacije i diferencijacije u izvršne ili memorijske stanice. Memorijske stanice posjeduju imunosno pamćenje, tj. pri ponovnom susretu s istim antigenom prisjećaju se konfiguracije antigena iz prethodnog dodira, te u vrlo kratkom vremenu odgovaraju jačom imunosnom reakcijom. Ta reakcija koju karakterizira „booster učinak“ se još naziva i anamnestička imunosna reakcija. Sposobnost pamćenja u okviru stečenog imunosnog odgovora od praktičnog je značaja za primijenjenu imunologiju, budući je temelj za primjenu cjepiva u imunoprofilaksi peradi (ERF, 2004.; PEI i sur., 2003.).

Osim diferencijacije u memorijske stanice, T limfociti se istovremeno diferenciraju u izvršne T limfocite, a B limfociti u plazma stanice koje proizvode i izlučuju protutijela. Humoralni imunosni odgovor zasniva se na vezanju protutijela s površinskim bjelančevinama

bakterija, parazita i virusa. Nakon zaražavanja, protutijelo pokreće ili pojačava imunosne mehanizme kojima pomaže u uklanjanju patogena. Te mehanizme čine klasični put aktivacije sustava komplementa usmjerenog protiv antigena, priprema antigena putem opsonizacije, aglutinacije ili precipitacije, za fagocitozu , neutralizacija antigena i timesprječavanje prodora u stanicu. Na taj način se vežu za površinske antigene na zaraženoj stanici i potiču citotoksične stanice na uklanjanje zaraženih ili tumorskih stanica.(ERF, 2004.). Stanična imunost posredovana je citotoksičnim T limfocitima.

Obje grane, humoralna i stanična, imunosnog odgovora međusobno blisko surađuju što se usklađuje topivim molekulama (citokini). Prevladavanje humoralnog ili staničnog imunosnog odgovora ovisi o uzročniku infekcije, a određuje ga tip pomoćničkih T limfocita. (DEGEN i sur., 2005.). Humoralni imunosni odgovor je uglavnom usmjeren na izvanstaničnu fazu bakterijske i virusne zaraze, a stanični prema gljivicama, parazitima, unutarstaničnoj fazi virusnih infekcija, tumorskim stanicama i presađenom tkivu (DEGEN i sur., 2005.; KEISER, 2010.; SHARMA i RAUTENSCHLEIN, 2013.).

3.3. Cijepljenje

Glavni pristup kontroli zaraznog bronhitisa je upotreba živih ili inaktiviranih cjepiva. Međutim, nijedna mjera kontrole neće biti potpuna ukoliko se ne vodi računa o biosigurnosti.

Pilići tek oporavljeni od bolesti ili oni nedavno cijepljeni su zaštićeni od istog soja virusa (homologna zaštita) ali ih to ne štiti od drugih sojeva virusa zaraznog bronhitisa. Cijepljenje ptica s homolognim virusom rezultira znatno nižim izlučivanjem virusa i to za kratko razdoblje nego što je to kod necijepljenih ptica.

Vrijedno je naglasiti da programi imunoprofilakse moraju biti prilagođeni na način da zadovolje lokalne uvjete koji uključuju uočenu prijetnju infekcije, a osobito temeljem tipizacije divljih sojeva virusa. Jedini praktični način kontrole zaraznog bronhitisa je cijepljenje koje se rutinski koristi u peradarstvu. U oblikovanju cijepnog programa protiv zaraznog bronhitisa treba znati da i cjepna imunost ne traje dugo pa su nužna docijepljivanja, da je važan izbor odgovarajućeg soja cjepiva za određeno područje uslijed postojanja brojnih varijanti i da će se vrijeme i način cijepljenja jako razlikovati s obzirom na vrstu i tehnologiju proizvodnje. Uvijek treba biti oprezan s uvođenjem takozvanih varijantnih cjepiva. Ona su pripravljena od različitih živih serotipova što olakšava nastanak i širenje novih virusnih tipova. Kombinirana

primjena može uzrokovati interferenciju dajući nepredvidive rezultate, dok inaktivirana cjepiva ne potiču lokalnu imunost.

Živa cjepiva koja se koriste za imunizaciju mogu uzrokovati blage respiratorne simptome, a važna su za cijepljenje tovnih pilića.

Mass/Mass 41/H120/55 i ostala cjepiva od Massachusetts soja su najčešće korištena cjepiva i upotrebljavaju se u mnogim zemljama.

Cilj programa cijepjenja je pokriti spektar izolata u određenoj zemlji ili regiji. Kada cijepljenje s jednim serotipom ne pruža dovoljnu zaštitu protiv prevladavajućih sojeva, može se provesti docijepljivanje drugim cijepnim sojem kako bi se postigao širi zaštitni spektar. Inaktivirana uljna cjepiva se primjenjuju kod uzgajivača prije početka proizvodnje jaja U pilenki u dobi 10-18 tjedana ovisno o programu cijepjenja. Inaktivirana cjepiva moraju se primijeniti pojedinačno na pticama, intramuskularno ili subkutano, a stvaraju visoku razinu serumskih protutijela i povećavaju zaštitu unutarnjih tkiva, bubrega i reproduktivnog trakta. U usporedbi sa živim cjepivima, inaktivirana cjepiva nisu ni blizu toliko djelotvorna u zaštiti dišnog sustava.

U eksperimentalnim uvjetima živa cjepiva se obično primjenjuju pojedinačno okulonazalnom aplikacijom.

Na terenu, živa cjepiva se obično apliciraju masovno raspršivanjem ili u vodi za piće. Cijepljenje raspršivanjem jednodnevnih pilićima je efikasna i rutinski se provodi, posebno u kod tovnih pilića, već u valionici budući se može puno bolje kontrolirati nego u peradnjaku.

Aplikacija cjepiva putem vode za piće zahtjeva mjere managementa koje treba poduzeti kako bi se osiguralo da sve ptice mogu popiti dovoljnu količinu svježe pripremljenog cjepiva kroz nekoliko sati. Voda koja se koristi za pripremu cjepiva mora biti visoke kvalitete, hladna i bez kemikalija koje mogu inaktivirati cjepivo, kao što su npr. dezinficijensi. Do danas, niti jedno cjepivo protiv zaraznog bronhitisa se ne aplicira *in ovo*, a sva komercijalno dostupna cjepiva mogu smanjiti nesivost, ponekad i do neprihvatljivih razina.

Generalno, dostupna živa i inaktivirana cjepiva su uspješna u zaštiti protiv zaraznog bronhitisa, pod uvjetom da se primjenjuju na način da svaka ptica dobije punu dozu. Treba imati na umu da svaka nova varijanta virusa ne zahtijeva razvoj homolognog cjepiva što se temelji na tzv. protektotipovima. Pokazalo se da upotreba kombinacija postojećih cjepiva pruža imunitet protiv niza sojeva virusa protiv kojih pojedina cjepiva ne pružaju zaštitu.

Strategija pod nazivom protektotip sastoji se u primjeni cjepiva s dva ili više serotipova virusa što omogućuje zaštitu organizma od širokog spektra heterolognih virusnih genoma (COOK, 2012.). Ova se strategija bazira na reduciranju infekcije uzrokovane virusom zaraznog bronhitisa kako bi se reduciralo uništenje cilija u dušniku i tako spriječila sekundarne infekcije. Protektotip strategija koristi serotipove Mass i 793B kao najraširenije serotipove u većini svijeta koji omogućuju najveću unakrižnu zaštitu, pogotovo ako se Mass serotip daje na dan izlijeganja pilića, a 793B 14 dana kasnije. Međutim, iako je Mass cjepivo dostupno u gotovo svim državama, serotip 793B nije tako čest pa se njegovo uvođenje u cjepni program države u kojima nije izoliran ne preporuča. Iz tog razloga je ispitano još nekoliko kombinacija ali ni jedna nije pokazala zaštitni učinak kao kombinacija Mass i 793B cjepiva. U fazi kliničkog ispitivanja su rekombinantna cjepiva koja ekspimiraju antigene S proteina i kombinirana s antigenima drugih patogena, no moraju pokazati ista zaštitna svojstva kao i živa oslabljena cjepiva. Dok su postojeća cjepiva generalno vrlo zadovoljavajuća, nekoliko laboratorija radi na razvijanju cjepiva „nove generacije“. Ona su izvedena molekularnim metodama, a većina njih ima za cilj omogućiti prilagođavanje cjepiva posebnim lokalnim zahtjevima. Vektorska cjepiva se izrađuju na način da se gen S1 receptora virusa zaraznog bronhitisa prenosi herpesvirusom, poxvirusom ili adenovirusom, a razvijena su i DNA cjepiva. Najobećavajuće cjepivo je ono proizvedeno postupkom obrnute genetike, pri čemu se radi kopija DNA od RNA genoma koji omogućuje jednostavnu ugradnju ili uklanjanje gena. Za virus zaraznog bronhitisa, novi odgovarajući S1 gen može lako biti uključen i RNA kopija virusa je onda rekonstruirana od homologne DNA. Ovo cjepivo se pokazalo obećavajućim u preliminarnim istraživanjima. Sažetak rezultata petogodišnjeg istraživanja dijagnostičkog laboratorija u Europi pokazuje da je zarazni bronhitis najčešća dišna bolest u peradi. Istraživanje je uključivalo jata samo u Francuskoj kao najvećeg europskog proizvođača mesa peradi. Tijekom 2009. godine je uzorkovan najveći broj uzoraka, a više od pola testiranih uzgajivača je bilo pozitivno na virus zaraznog bronhitisa. Između 2007. i 2009. prosjek je bio 45,2 % pozitivnih. U 2010. godini broj pozitivnih testova je pao na 34%, ali neki od prikupljenih uzoraka se nisu mogli tipizirati vjerojatno zato što virus ima novi genotip koji nije osjetljiv na PCR test. Najčešći soj virusa u Europi je 793B, koji se prvi put pojavio u Francuskoj 2005. Sljedeći najučestaliji sojevi virusa u Europi su Massachusetts i varijanta QX. Veterinari diljem Europe su zaključili da se za tovne piliće u područjima gdje su dominantni 793B i QX sojevi, cijepljenje na terenu sa sojem H120 tijekom 14. dana može zamijeniti cijepljenjem koje se može provesti u valionici, kako bi se spriječilo pogoršanje s kontaminacijom virusa. Za uzgajivača će plan cijepljenja ovisiti o situaciji u određenom

području ili na određenoj farmi, ali prava strategija je upotreba živih cjepiva, a zatim inaktiviranih cjepiva, pružajući tako široku zaštitu.

Kako bi se spriječile negativne posljedice na peradarstvo u Nizozemskoj je 2014. godine na tržište stavljeno cjepivo protiv varijante QX (Nobilis Primo QX, Intervet International B.V.) koje sadrži živi atenuirani soj virusa zaraznog bronhitisa D388. Cjepivo se primjenjuje u pilića od prvog dana.

4. RASPRAVA

Zarazni bronhitis je bolest proširena u cijelom svijetu i uzrokuje znatne gospodarske štete zbog velikog pomora pilića, pada nesivosti i lošije kakvoće jaja.

Danas veliki problem predstavlja razvoj novih sojeva, razlikovanje i tipizacija virusnih serotipova, te mogućnost globalnog širenja. Za točnu dijagnozu bolesti nisu dostatna klinička slika i razudba, već se virus mora izdvojiti i tipizirati, budući zbog programa imunoprofilakse serološka dijagnostika može biti otežana. Cilj detaljne dijagnoze je i isključiti ostale bolesti koje se javljaju u peradarstvu; newcastleska bolest, influenza ptica, zarazni laringotraheitis, sindrom pada nesivosti itd.

Da bi se spriječila i otklonila infekcija treba poduzeti sveobuhvatne profilaktičke mjere, od kojih važnu ulogu imaju biosigurnosne mjere, no najvažnija mjera je cijepljenje mladih jedinki kako bi se specifično potaknuo imunitet i smanjio rizik od bolesti. Generalno, dostupna cjepiva pružaju dobru zaštitu protiv zaraznog bronhitisa ako se primjenjuju prema uputama, tj. ako svaka ptica primi punu dozu.

Sve boljim poznavanjem virusa i imunosnog odgovora na njega radi se na novim generacijama cjepiva protiv zaraznog bronhitisa. Zarazni bronhitis će i dalje biti uzrok značajnih gubitaka unatoč razvoju novih cjepiva i protokola cijepljenja, no cilj je značajno reducirati postojeće gubitke. Čini se da će postojeća empirijski dobivena cjepiva primijenjena samostalno ili u kombinaciji biti i dalje glavni način kontrole bolesti, dok će u budućnosti nova generacija cjepiva morati dokazati svoju učinkovitost, pri čemu moraju biti sigurna, pristupačna i lako dobavljiva. Kada je riječ o samoj bolesti, evolucija virusa zaraznog bronhitisa može pridonijeti pojavi novih simptoma bolesti, kao što su enteritis i sterilitet mužjaka.

5. ZAKLJUČAK

Zarazni bronhitis jedna je od najznačajnijih bolesti u modernom peradarstvu, a rasprostranjena je diljem svijeta, po svim kontinentima. Bolest je od velikog ekonomskog značaja u komercijalnom uzgoju peradi.

- Za dijagnozu bolesti potrebna je laboratorijska, ponajprije molekularna dijagnostika i tipizacija izdvojenih sojeva virusa.
- Postoji mnogo različitih serotipova virusa zaraznog bronhitisa, a novi ili varijantni serotipovi nisu u potpunosti pod kontrolom cjepiva i javljaju se sve češće.
- Neke varijante mogu nastati rekombinacijom između postojećih divljih i cjepnih sojeva, dok su druge rezultat brzih mutacija divljih sojeva.
- Izbor cjepiva treba se zasnivati na saznanju o najraširenijim serotipovima u lokalnom području.
- Vrlo je važno da svaka nova varijanta virusa ne zahtijeva razvoj homolognog cjepiva, već po principu tzv. protektotipova, dobra kombinacija cjepnih sojeva omogućava unakrižnu zaštitu i protiv nehomolognih sojeva.
- Nove generacije cjepiva, ukoliko pokažu svoju učinkovitost, budu sigurna i pristupačna uvelike će pridonijeti kontroli i suzbijanju zaraznog bronhitisa peradi.

6. LITERATURA

1. ARSHAD, S.S.(2006.): Infectious bronchitis. U: Diseases of Poultry in South East Asia, M.Zamri-Saad, Ed., Universiti Putra Malaysia Press, Serdang, Malaysia, 199-506
2. ADZHAR, A., D.SHAWN (1997.): Isolation of avian infectious bronchitis virus from experimentally infected chickens, Res. Vet. Sci 26, 344-347.
3. ALEXANDER, D.J., R.E.GOUGH (1977.): Isolation of avian infectious bronchitis virus from experimentally infected chickens, Res. Vet. Sci 23, 344-347.
4. BACON, L.D., D.B.HUNTER, H.M.ZHANG, K.BRAND, R.ETCHE (2004.): Retrospective evidence that the MHC of chickens influences genetic resistance to attenuated infectious bronchitis vaccine strains in chickens, Avian Pathology 33, 605-609.
5. BALENOVIĆ, M., M.POPOVIĆ, V.SAVIĆ, D.KEZIĆ, K.VLAHOVIĆ, A.DOVČ, G.BEZROK, I.POPOVIĆ, I.VALPOTIĆ (2007.): Kvantitativna imunofenotipizacija T-limfocita periferne krvi kokoši nesilica. Prax. Vet. 55, 33-39
6. BANDE, F., S.S. ARSHAD, M.H. BEJO, H. MOEINI, A.R. OMAR (2015.): Progress and challenges toward the development of vaccines against avian infectious bronchitis, Journal Immunology Research, vol.2015., Article ID 424860, 12 pages
7. BIĐIN, Z (2008.): Zarazni bronhitis. U: Bolesti peradi, Veterinarski fakultet, Zagreb, Hrvatska, 73-79
8. BRUNE, K., M.S. LEFFEL, J.K.SPRINTL (1972.): Microbicidal activity of peroxidaseless chicken heterophile leukocytes. Infect Immun. 5, 283-287
9. CAVANAGH, D.(1992.): Evidence for recombination within the Massachusetts serotype, Avian Pathology 21, 401-408.
10. CAVANAGH, D. (1983.): Coronavirus IBV; structural characterization of the spike protein. J. Gen. Virol. 64, 2577-2583
11. CAVANAGH, D. (2002.): Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. Avian Pathology 32, 567-582.
12. CAVANAGH, D. (2007.): Coronavirus avian infectious bronchitis virus. Veterinary Research 38, 281-297.

13. CAVANAGH ,D.,K.MAWDITT, D.D.B.WELCHMAN, P.BRITTON, R.E.GOUGH (1989.):Coronaviruses from pheasants are genetically closely related to coronaviruses of domestic fowl and turkeys, *Avian Pathology* 31, 81-93.
14. CAVANAGH, D. (2008.): *Coronaviridae: a review of coronaviruses and toroviruses*, 1-54
15. CAVANAGH, D., J.GELB (2008.):*Infectious bronchitis*. U: *Diseases of Poultry*, Blackwell,12th edition, 117-135.
16. COOK, J.K.A.(1984.): Duration of experimental infectious bronchitis in chickens. *Res.Vet.Sci.* 9, 506- 514.
17. COOK, J.K.A.,T.H. DAVISON, M.M.HUGGINS(1991): Effect of in ovo bursectomy on the course of an infectious bronchitis virus infection in line C Lefhorn chickens. *Arch Virol* 118, 225-234.
18. COOK, J.K, M.JACKWOOD, R.C. JONES (2012): The long view: 40 years of infectious bronchitis research. *Avian Pathology* 41, 239-250.
19. COOK, K.A, K.OTSUKI, N.R. MARTINS(1992.): The secretory antibody response of inbred lines of chicken to avian infectious bronchitis virus infection.*Avian Pathology* 21, 681-692
20. COOK, J.K.A.(2012.): The long view: 40 years of infectious bronchitis research, *Avian Pathology* 41, 239-250.
21. CRINION, R.A., M.S.HOFSTAD (1972.): Pathogenicity of four serotypes of avian infectious bronchitis for the oviduct of young chickens.*Avian Dis.* 2, 351-363.
22. DALGAARD, T.S.(2010.): Effects of cyclosporin A induced T-lymphocyte depletion on the course of avian Metapneumovirus infection in turkey, *Developmental & Comparative Immunology* 34, 518-529.
23. DAVELAAR, F.G.,B.KOUWENHOVEN, A.G.BURGER(1984.): Occurrence and significance of infectious bronchitis viruses variant strains in egg and broiler production in the Netherlands. *Vet.Q.* 6, 114-120.
24. DAVIES, H.A., R.R. DOURMASHKIG (1979.): Comparison of the morphology of three coronaviruses. *Arch.Virol.* 59, 25-33
25. DE WIT J.J.S., J.K.A. COOK (2020.): Spotlight on avian coronaviruses, *Avian Pathology* 49, 313-316.

26. DHINAKAR, R., G., R.C.JONES(1996.): Immunopathogenesis of infections in SRF chicks and commercial broilers of a variant infectious bronchitis viruses of economic importance, *Avian Pathology* 25, 481-501.
27. DHINAKAR, R.G., R.C.JONES(1997.): Infectious bronchitis virus: immunopathogenesis of infections in chickens; *Avian Pathology* 26, 677-706
28. ERF, G.F.(2004.): Cell-mediated immunity in poultry, *Poultry science* 83(4), 580-890.
29. GELB, J., B.S.LANDMAN, P.A.SCHNEIDER, S.DAVIDSON, P.G.MILLER, H.LU, D.WEINSTOCK, M.SALEM, R.J.ECKROADE(1997.): Nephropatogenic infectious bronchitis in Pennsylvania chickens, *Avian diseases* 46, 847-858.
30. GELB, J., D. CAVANAGH (2008.): Infectious Bronchitis. U: Diseases of poultry (Ur. Saif, Y.M., i sur.) Iowa State University Press, Iowa, SAD, 117-135.
31. GERLACH, H.(1994.): *Avian Medicine: Principles and Application*, Wingers Publishing Inc., Lake Worth, Florida., SAD, 1056-1063
32. JUNGHERR, E.L.(1956.): Immunological differences in strains of infectious bronchitis virus., *Proceedings of 60th Annual Meeting of the United States Livestock Sanitary Association*, 203-209
33. IGNJATOVIĆ, J., S.SAPATS (2000.): Avian infectious bronchitis virus. *Rev.sci.teh.Off.int.Epiz.* 19, 493-508.
34. IGNJATOVIĆ, J., D.F.A ASHTON, R.REECE, P.SCOTT, P.HOOPER (2002.): Pathogenicity of Australian strains of avian infectious bronchitis virus. *Journal of Comparative Pathology* 126, 115-123.
35. JAYARAM J., S.YOUNG, E.W. COLLISSIN (2005.): The virion N protein of infectious bronchitis virus is more phosphorylated than the N protein from infected cell lysates. *Virology* 339, 127-135.
36. JONES, R.C(2001.): Infectious bronchitis – a worldwide problem. *Poultry Int.* 40, 18-23.
37. KAISER, P. (2010.): Advances in avian immunology-prospects for disease control, *Avian Pathology* 39, 309-324.
38. KING, D.J., D. CAVANAGH(1991.): Infectious bronchitis. U: Diseases of poultry. Iowa States University Press, Iowa, SAD, 471-481.
39. LIN, Z. A.KATO, Y.KOUDOU, S .UEDA (1991): A new typing method for the avian infectious bronchitis virus using polymerase chain reaction and restriction enzyme fragment length polymorphism, *Archives of Virology* 116, 19-31.

40. LIN,Z., A.KATO, Y.KOUDOU, K. UEDA, S. UEDA(1991): Typing of recent infectious bronchitis virus isolates causing nephritis in chicken“, Archives of Virology 120, 145-149.
41. MAZIJA,H., M.KRALJ, S.CVETNIĆ, M.HERCEG, Ž.BOMBEEK (1969.): Istraživanje epizootologije zaraznog bronhitisa peradi i Izolacija virusa zaraznog bronhitisa u Hrvatskoj.Vet.Ahiv 39, 11-15.
42. MAXWELL,M.H., G.W.ROBERTSON(1998): The avian heterophil leucocyte,World Poultry Science Journal 54(2), 155-178.
43. MILLER,L.T., V.J.YATES(1968.):Neutralisation og infectious virus human sera, American journal of epidemiology 88(3),406-409.
44. OTSUKI, K. ,M.B.HUGGINS, J.A.COOK(1974.): Studies on avian infectious bronchitis virus (IBV). Resistance of IBV to chemical and physical treatments. Arch. Virol. 60,25-32.
45. POHL ,R.(1974.): The histopathogenesis of nephrosisnephritis syndrome, Avian Pathol. 20, 663-673.
46. PATTERSON, S., R.W.BINGHAM (1976.): Electron microscope opservations on the entry of avian infectious bronchitis virus into susceptible cells, Archives of Virology 52, 191-200.
47. QURESHI, M.A., C.L.HEGGEN, I. HUSSAIN(2000.): Avian macrophage:effector functions in health and disease, Developmental & Comparative Immunology 24(2-3), 103-119.
48. SCHALK,A.F.,M.C.HAWN(1931.): An apparently new respiratory disease of baby chicks. Journal of the American Veterinary Medical Association 78, 413-422.
49. SHARMA, J.M., S.RAUTENSCHLEIN(2013.): Host factors for disease resistance. U: Diseases of poultry13th ed..ur.J.R.GLISSON, L.R.McDOUGALD, V.NAIR, L.K.NOLAN, D.SUAREZ.,Blackwell Publishing Ltd, Ames, Iowa, SAD, 61-82.
50. STURMAN, L.S., K.V.HOLMES(1983.): The molecular biology of coronaviruses, Adv.Virus Res. 29, 35-112.
51. OTSUKI, K., H. YAMAMOTO (1979.): Studies on avian infectious bronchitis virus (IBV). Archives of Virology 24, 152-162.
52. WEI, Z.J., P.WEI, M.L.MO, M. Li, T. C. WEI, K.R.LI(2008.): Genetic variati hypervariable region I of infectious bronchitis viruses isolated id different period sin Guangxi. Chinese Journal of Virology 24, 162-162.
- 53.WIGLEY, P.,P.KAISER (2003.): Avian cytokines in health and disease. Rev.Bras.Ciencia Avicola 5, 1-14.

54. WILLIAMS, A.K., W.LI, L.W.SNEED, E.W.COLLISSON (1992.): Comparative analyses of the nucleocapsid genes of several strains of infectious bronchitis virus and other coronaviruses“, *Virus Research* 25, 213-222.

7. SAŽETAK

Kontrola i prevencija zaraznog bronhitisa na farmama peradi

U ovom radu obrađen je zarazni bronhitis peradi kao jedna od najvažnijih bolesti u peradarstvu, a koja uzrokuje velike gospodarske štete.

Uzročnik zaraznog bronhitisa je ptičji koronavirus koji je prisutan u cijelom svijetu. Zaraza, ovisno o soju virusa, uzrokuje upalu gornjih dišnih puteva, pad nesivosti i kakvoće jaja i nefritis. Dijagnostika zaraznog bronhitisa provodi se različitim metodama. Izbor metode ovisi o vrsti uzorka, dostupnosti ispitivanog materijala, svrsi ispitivanja i da li se provodi na terenu ili u laboratoriju. U prošlosti su se serološka ispitivanja kao što su virus neutralizacijski test (VN) i inhibicija hemaglutinacije (IH) koristila naširoko za otkrivanje i serotipizaciju virusa zaraznog bronhitisa. Danas se ELISA metoda najčešće koristi za serologiju, a molekularne metode za dokaz i tipizaciju virusa.

Glavni pristup u kontroli zaraznog bronhitisa je upotreba živih ili inaktiviranih cjepiva. Generalno, dostupna živa i inaktivirana cjepiva su uspješna u zaštiti protiv zaraznog bronhitisa, pod uvjetom da svaka ptica dobije punu dozu.

Dok su postojeća cjepiva generalno vrlo zadovoljavajuća, nekoliko laboratorija radi na razvijanju cjepiva „nove generacije“. Ona su izvedena molekularnim metodama, a većina njih ima za cilj omogućiti prilagođavanje cjepiva posebnim lokalnim zahtjevima.

Ključne riječi: zarazni bronhitis, perad, dijagnoza, cijepljenje

8. SUMMARY

Control and prevention of infectious bronchitis on poultry farms

This paper deals with infectious bronchitis as one of the most important diseases in chickens, which causes great economic losses.

Infectious bronchitis is caused by avian coronavirus, which is found worldwide. Infections, depending on the strain, may cause an acute upper-respiratory tract disease, drop in egg production, decreased in egg quality, and nephritis. Conventional and more advanced methods have been used for the diagnosis of IBV infection. The choice on one test over another is guided by type of sample, availability of the test materials and facilities, test reporting time, purpose of the test, and whether the test is carried out in the field or at the laboratory. In the past, serological assays such as virus neutralisation (VN) and haemagglutination inhibition (HI) were used widely for detecting and serotyping of IBV strains. Today ELISA is most frequently used for serology, and molecular methods for virus detection and typing.

The main approach to control of IB is by the use of live and killed vaccines. Generally, the available live and killed vaccines provide a very good protection against IB, only if they are delivered accurately so that each bird received a full dose. While the current vaccines are generally very satisfactory, several laboratories have worked on the development of new generation vaccines. These have been designed by molecular methods, most of which are intended to enable vaccines to be tailored to particular local requirements.

Keywords: infectious bronchitis, poultry, diagnosis, vaccination

9. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 26.02.1984. u Pakracu. Nakon završene osnovne škole, upisala sam Opću gimnaziju u Daruvaru. Veterinarski fakultet u Zagrebu upisala sam 2002. godine. Majka sam jednog sina.