

# Praćenje titra specifičnih protutijela potaknutog autogenim cjepivom protiv APEC sojeva E. coli na roditeljskim farmama teške pasmine kokoši

---

Čelebić, Inga

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:178:669266>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-24**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu**

**Veterinarski fakultet**

INGA ČELEBIĆ

**Praćenje titra specifičnih protutijela potaknutog autogenim cjepivom protiv APEC  
sojeva *E. coli* na roditeljskim farmama teške pasmine kokoši**

Diplomski rad

Zagreb 2021.

**Naziv zavoda:** Zavod za bolesti peradi s klinikom

**Predstojnik zavoda:** Izv. prof. dr. sc. Željko Gottstein

**Mentor:** Izv. prof. dr. sc. Željko Gottstein, doc. dr. sc. Dubravko Pavoković (PMF)

**Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:**

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

## **Popis tablica i slika**

Tablica 1. Rezultati ELISA titra specifičnih protutijela u necijepljenim jatima, te prije i nakon cijepljenja autogenim cjepivom protiv APEC sojeva (srednja vrijednost  $\pm$  SD)

Slika 1. ELISA titar specifičnih serumskih protutijela za APEC antigen (srednja vrijednost  $\pm$  SD) na farmi 1.

Slika 2. ELISA titar specifičnih serumskih protutijela za APEC antigen (srednja vrijednost  $\pm$  SD) na farmi 2.

Slika 3. ELISA titar specifičnih serumskih protutijela za APEC antigen (srednja vrijednost  $\pm$  SD) kod cijepljenog jata 1 i necijepljenih jata 2 do 4 na farmi 3.

## **SADRŽAJ:**

1. UVOD .....	1
2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA .....	3
2.1. APEC sojevi .....	3
2.2. Komercijalna i autogena cjeviva.....	5
2.3. ELISA .....	6
3. MATERIJALI I METODE.....	6
3.1. Priprema cjeviva, cijepljenje i uzorkovanje seruma.....	7
3.2. Priprema ELISA kita.....	7
3.3. Statistička analiza.....	8
4. REZULTATI .....	9
5. RASPRAVA .....	14
6. ZAKLJUČCI.....	16
7. POPIS LITERATURE.....	17
8. SAŽETAK .....	21
9. ABSTRACT .....	22
10. ŽIVOTOPIS.....	23

## 1. UVOD

Bakterija *Escherichia coli* najubikvitarniji je mikroorganizam na Zemlji (EL JAKE i sur., 2016.), a njen najvažniji rezervoar je probavni sustav ljudi i životinja pa tako i ptica. Ptice već u prvim satima nakon valjenja stvaraju vlastitu floru bakterija *E.coli* koje osim sluznice crijeva koloniziraju i gornji dio dišnog sustava, prvenstveno dušnik i ždrijelo (LUTFUL KABIR, 2010.). Ova bakterija nužna je za pravilnu probavu hrane te kao komenzal sudjeluje u održavanju zdravlja jedinke i uspostavljanju ravnoteže crijevne flore peradi. Ipak, postoji mnogo različitih serotipova *E. coli*, pa čak i unutar jedne jedinke, od kojih je većina apatogena (MELLATA, 2013.). No, stjecanjem specifičnih svojstava virulencije, određena skupina ovih bakterija razvila je sposobnost preživljavanja u različitim organizmima i uzrokovala kliničke značajke povezane sa crijevnim i izvancrijevnim infekcijama (KUNERT FILHO, 2015.a.). Izvancrijevne infekcije uzrokovane ptičjim patogenim sojevima *E.coli* (eng. avian pathogenic *E. coli*, APEC) poznate su kao kolibaciloza, a karakterizirane su fibrinoznim naslagama oko viscelarnih organa kao posljedica septikemije, omfalitisa, peritonitisa, celulitisa, upale zračnih vrećica, sindroma otečene glave itd. (LINDEN., 2015.). Kolibaciloza je jedna od najznačajnijih zaraznih bolesti u proizvodnji peradi, a dovodi do smanjene proizvodnje, kvalitete i leživosti jaja (KUNERT FILHO, 2015.a.). Utječe na sve cikluse proizvodnje i sve sektore peradarske industrije. Uzrokujući visoki morbiditet i smrtnost pilića, tovnih i nesilica, nanosi velike gospodarske štete (KUNERT FILHO, 2015.a.). Redovito se javlja istovremeno s drugim bolestima što otežava dijagnostiku (LINDEN., 2015.). SOLÀ-GINÉS i sur. (2015.a.) navode da su glavni uzrok kolibaciloze u peradi upravo APEC sojevi te da su odgovorni za ugibanje 2-3% domaćih životinja i za smanjenje nesivosti za 2-3%. Sličnu filogenu pozadinu i određene gene virulencije posjeduju i APEC sojevi i ljudska izvancrijevna patogena *E.coli* (ExPEC) te su stoga proizvodi od peradi kontaminirani APEC-om potencijalni izvor zaraze za ljude (SUN i sur., 2015.). Nadalje, dugogodišnja raširena i prekomjerna uporaba antibiotika u peradarskoj industriji kao promotora rasta, zatim u liječenju i prevenciji kolibaciloze, pridonijela je pojavi i razvoju rezistentnih, odnosno multirezistentnih sojeva. Konzumacija takvih kontaminiranih proizvoda od peradi, uključujući i jaja, omogućila je daljnji prijenos rezistencije na čovjeka (JOHNSON i sur., 2007.). Zbog navedenih razloga dostupnost učinkovitih antimikrobnih sredstava se smanjila i njihova uporaba ograničila (LINDEN, 2015.), a samim time se javila potreba za imunoprofilaksom u svrhu dodatne zaštite rasplodnih jata i njihovog potomstva (GOTTSTEIN i sur., 2019.). Međutim, iako se cijepljenjem i uporabom antibiotika postižu

dobri rezultati, učinkovita kontrola i prevencija kolibaciloze temelji se na identifikaciji i uklanjanju predisponirajućih uzroka nastanka bolesti redovitim praćenjem stanja na farmi. Zatim smanjenju razine izloženosti *E. coli* poboljšanjem biološke sigurnosti, sanitacije, ventilacije, prehrane i imuniteta jata (LINDEN, 2015.). Takvim principom rada stvara se zdravo jato, čiji je imunosni sustav dovoljno jak i sposoban boriti se protiv različitih patogenih mikroorganizama.

## 2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

### 2.1. APEC sojevi

Patogeni sojevi *E. coli* koji uzrokuju izvancrijevne infekcije (eng. extraintestinal pathogenic *E. coli*, ExPEC) dijele se u šest patotipova – uropatogeni sojevi *E. coli* (eng. uropathogenic *E. coli*, UPEC), sojevi *E. coli* uzročnici meningitisa novorođenčadi (eng. newborn meningitis *E. coli*, NMEC), ptičji patogeni sojevi *E. coli* (eng. avian pathogenic *E. coli*, APEC), septikemijski sojevi *E. coli* (eng. septicaemia associated *E. coli*, SePEC), sojevi *E. coli* patogeni za mliječnu žlijezdu (eng. mammary pathogenic *E. coli*, MPEC) i sojevi *E. coli* patogeni za endometrij (eng. endometrial pathogenic *E. coli*, EnPEC), (KUNERT FILHO i sur., 2015.a.). Najveći značaj za peradarsku proizvodnju ima upravo ptičja patogena *Escherichia coli* (APEC) kao glavni uzrok kolibaciloze u peradi (SOLA GINES, 2015.b.). Prema BIĐINU (2008) kolibaciloza je svaka lokalizirana ili sistemska zaraza uzrokovana ubikvitarnom bakterijom *E. coli* koja nastanjuje sluzničke površine. Bolest se manifestira obično izvan crijeva i najčešće se javlja u dušnim organima u obliku upale zračnih vrećica ili poliserozitisa, zatim pupku kao infekcija u tek izvaljenih pilića ili kao neonatalna sepsa, te koži (sindrom natečene glave i celulitis) i reproduktivnim organima (salpingitis, peritonitis i ooforitis) (POULSEN i sur., 2020.). Patogeneza kolibaciloze često je nejasna (SOLA GINES, 2015. a.), a mehanizmi pomoću kojih ptičja patogena *E. coli* uzrokuje infekciju su uglavnom nepoznati (DHAMA i sur., 2013.). Mlađe jedinke u razdoblju rasta češće obolijevaju nego starije (LINDEN., 2015.). Kolibaciloza se može javiti kao posljedica primarne infekcije APEC sojevima ili češće kao sekundarne (oportunističke) infekcije. Sekundarno se često javljaju zbog oštećenja respiratornog trakta uzrokovanog virusnim i bakterijskim patogenima (npr. virus newcatleske bolesti, virus zaraznog bronhitisa, *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *P. multocida*, zarazni laringotraheitis itd.) te uslijed izazvanog stresa u peradi, što je osobito izraženo na početku proizvodnje jaja (LINDEN, 2015.). Glavni ulazni put *E. coli* je gornji dišni sustav, a odatle se širi na druge organe što rezultira generaliziranom infekcijom i dovodi do uginuća (KUNERT FILHO i sur., 2015.a.). APEC sojevi su genetski vrlo raznoliki i mogu imati poseban sastav gena virulencije, a genetska svojstva koja definiraju APEC nisu u potpunosti razjašnjena (MELLATA, 2013.). Međutim, studije hibridizacije otkrile su DNA sekvence specifične za APEC koje pokazuju visoku razinu sličnosti s DNA sekvencama humanih ekstraintestinalnih patogenih sojeva *E. coli*. Obje vrste imaju zajedničke odrednice virulencije, što ukazuje da bi APEC mogao poslužiti kao rezervoar i izvor virulencije za ExPEC, odnosno sugerira se da APEC sojevi imaju zoonotski potencijal (SOLA GINES, 2015. b.). Naime, multirezistentni



sojevi *E.coli* porijeklom iz crijeva peradi mogu zaraziti ljude izravno hranom i to konzumacijom kontaminiranog mesa, a zatim kolonizirati njihov probavni trakt i doprinijeti razvoju rezistentnih gena u humanoj fiziološkoj crijevnoj flori. Osim mesa, važnu ulogu u zaražavanju ljudi mogu imati i jaja porijeklom od kokoši nesilica koje pate od ooforitisa ili salpingitisa izazvanog s *E.coli* (LUTFUL KABIR, 2010.). Salpingitis ili pojava salpingitisa u kombinaciji s peritonitisom, smatraju se najčešćom bakterijskom infekcijom u kokoši nesilica (LINDEN, 2015.), a u rasplodnih jedinki ujedno predstavljaju i rizik za zarazu potomaka vertikalnim prijenosom (POULSEN i sur., 2020.). Jaja se mogu inficirati prije stvaranja ljuske ili pak do infekcije dolazi uslijed fekalne kontaminacije ljuske jajeta tijekom prolaska kroz kloaku ili nakon polaganja jajeta. Rezultat toga je prodor *E. coli* kroz ljusku i zaražavanje pilića tijekom inkubacije, što je nerijetko popraćeno visokim stopama smrtnosti (LUTFUL KABIR, 2010.). Sljedeći problem povezan s APEC sojevima je visoka stopa rezistencije na kritično važne antimikrobne lijekove, prvenstveno tetracikline i cefalosporine treće generacije (SOLA GINES i sur., 2015.a.). Tome je mogla uvelike pridonijeti neselektivna uporaba antibiotika tijekom razvoja peradarske industrije (KUNERT FILHO i sur., 2015.a.). Tada su se antibiotici intenzivno koristili u prevenciji i liječenju kolibaciloze te su davani peradi u hrani ili pitkoj vodi kao promotori rasta (MELLATA, 2013.), a najčešće primjenjivani su tetraciklinski antibiotici, sulfonamidi i fluorokinoloni (ŠIMPRAGA, 2012.). Godinama su antibiotici pridonosili zdravlju i dobrobiti peradi. Međutim, njihova prekomjerna uporaba i zlouporaba te povećana potrošnja proizvoda od peradi, svakako su pridonijeli pojavi i razvoju rezistencije na antibiotike te njen daljnji prijenos na ljude i okoliš (MELLATA, 2013.; LINDEN, 2015.). Iako antibiotici još uvijek predstavljaju temelj u liječenju i kontroli kolibaciloze u intenzivnoj peradarskoj proizvodnji (ŠIMPRAGA, 2012), dostupnost učinkovitih antimikrobnih sredstava se smanjila (LINDEN, 2015). Zato je veoma važno, prije početka liječenja, provjeriti osjetljivost izdvojenih sojeva na pojedini antimikrobni pripravak, kako bi se izbjeglo neučinkovito liječenje, širenje rezistencije i veliki ekonomski gubici (LINDEN, 2015.; DHAMA i sur., 2013.). Nadalje, u provođenju profilakse od posebnog je značaja tipizacija te utvrđivanje proširenosti prisutnih APEC sojeva jer je kolibaciloza uzrokovana širokim rasponom serotipova *E coli* (COLLINGWOOD i sur., 2014.), a najčešće sa O2:K1 i O78:K80 (MELAMED i sur., 1991.). APEC sojevi klasificirani su u serogrupe kao O:K:H serotipovi (KUNERT FILHO i sur., 2015.b.), a serotipizacija je uobičajena metoda za procjenu patogenog potencijala APEC sojeva jer je utvrđeno i prihvaćeno da se serotipovi O1, O2, O18 i O78 učestalo pojavljuju (EWERS i sur., 2009.). Pojedini serotipovi *E.coli*, kao što su O1 i O78, predstavljaju visoko patogene

varijante APEC-a, a razlog tome je posjedovanje genetske okosnice potrebne za stjecanje mehanizma virulencije (COLLINGWOOD i sur., 2014.).

## **2.2. Komercijalna i autogena cjepiva**

Zbog kontinuirane izloženosti bakterijama *E.coli* u okolišu, perad može oboljeti od kolibaciloze u bilo kojem trenutku tijekom razdoblja rasta i nesivosti. Osim toga, primjena antimikrobnih sredstava u prevenciji bolesti je skupa i nije uvijek učinkovita metoda (MELAMED i sur., 1991.). Stoga se cijepjenje pokazalo kao jedna od mogućih opcija u smanjenju učestale pojave kolibaciloze kao i smanjenju gubitaka koje je ista prouzrokovala, dajući imunom sustavu organizma priliku da se samostalno izbori s APEC sojevima (GOTTSTEIN i sur., 2017.). Međutim, postoje određene implikacije u kontroli bolesti. Naime, teško je kontrolirati bakterije koje su obično komenzalne (COLLINGWOOD i sur., 2014.), a zbog velike raznolikosti APEC sojeva, ograničena je mogućnost cijepjenja te se cjepiva ne mogu koristiti u velikoj mjeri (LUTFUL KABIR, 2010.). Ultrazvučna inaktivacija *E. coli* praćena zračenjem jedna je od najučinkovitijih metoda za pripremu djelotvornog cjepiva protiv kolibaciloze, a ono mora pružati odgovarajuću zaštitu protiv najčešćih patogenih sojeva *E.coli*, O78:K80 i O2:K1 (MELAMED i sur., 1991.). Postoje dvije glavne vrste cjepiva koje se koriste u odraslih i mlađih jedinki i to su autogena inaktivirana te komercijalna modificirana cjepiva (LINDEN, 2015.). Autogeno cjepivo proizvodi se od sojeva *E.coli* koji su bakteriološkom pretragom izdvojeni iz peradi na određenoj farmi te je za istu farmu i namijenjeno. Pruža zaštitu samo protiv homolognih sojeva *E.coli* dok prilikom infekcije drugim sojevima zaštitni učinak cjepiva u pravilu nije dostatan. Injicira se u prsa peradi te smanjuje morbiditet i mortalitet jedinki uslijed infekcije *E.coli* (LINDEN, 2015.). Proizvodnja komercijalnih cjepiva bazira se na najčešće izdvojenim sojevima *E.coli* O1, O2, O18 i O78 (EWERS i sur., 2009.), a protiv prva tri soja pruža unakrižnu zaštitu (LINDEN, 2015.). Primjenjuje se u spreju te također smanjuje morbiditet i mortalitet peradi uslijed infekcije *E.coli* (LINDEN, 2015.). Međutim, u posljednjih nekoliko godina u prevenciji prevladava primjena autogenih cjepiva, a razlog tome je što se u praksi učinkovita zaštita postiže samo protiv homolognih sojeva *E. coli* (DHAMA i sur., 2013.). Nadalje, izradu i primjenu autogenih cjepiva dodatno opravdava i razvoj sve patogenijih sojeva i pojavnost novih, zatim pojava rezistencije na sve komercijalno dostupne antimikrobne pripravke te istovremeno zaražavanje sa nekoliko različitih sojeva u istom jatu i jedinki nerijetko i specifično vezanih uz pojedinu farmu (GOTTSTEIN i sur., 2017.). Upravo kombinirana autogena cjepiva

sačinjena od dominantno izdvojenih bakterijskih vrsta iz organa kokoši prilikom razudbe, mogu osigurati zaštitu, dok ju komercijalna, živa i inaktivirana cjepiva ne osiguravaju u dovoljnoj mjeri (GOTTSTEIN i sur., 2019.). Cijepljenje protiv APEC sojeva, posebno kod nesilica, vrlo je učinkovito te osigurava zaštitu sljedeće generacije od vertikalnog prijenosa bolesti dok kod pilića nema isti učinak (COLLINGWOOD i sur., 2014.). Naime, pilići starosti do 10 dana ne reagiraju na cijepljenje zbog nedovoljno razvijenog imunološkog sustava (HELLER i sur., 1990.). Iz tog razloga se pasivna imunizacija pilića putem vertikalnog prijenosa od roditelja pokazala kao najbolje rješenje jer štiti piliće do razvoja aktivne obrane te od širenja zaraze horizontalnim putem (GOTTSTEIN i sur., 2019.). Prema DHAMI i sur. (2013) ovakav pristup osigurava zaštitu pilića od zaraze homolognim sojevima tokom dva tjedna. Uslijed *E.coli* infekcije, klinička slika bolesti cijepljenih jedinki redovito je blaža, nego u necijepljenih (LINDEN., 2015.). Uz sve navedeno, važno je napomenuti da se pravodobnom primjenom odgovarajućeg cjepiva, redovitom kontrolom svakog jata te slijedećem programa prevencije i suzbijanja drugih važnih uzročnika bolesti u peradi, postiže učinkovita prevencija od APEC sojeva (DHAMA i sur., 2013.).

### **2.3. ELISA**

Imunoenzimni ELISA test zbog visoke osjetljivosti dosada se pokazao kao najbolja serološka metoda za otkrivanje protutijela protiv *E.coli*, posebno u ranim stadijima infekcije (LEITNER i sur., 1990.). Kod ELISA kitova temelji se na dokazu antitijela protiv APEC sojeva pomoću dva dominantna patogena serotipa sonificirane *E. coli*, O78: K80 i O2: K1 (LEITNER i sur., 1990.). U slučaju izrade i primjene autogenog cjepiva, za kontrolu imunosne reakcije potrebno je koristiti ELISA test za čiju izradu su korišteni sojevi identični onima u cjepivu.

## **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. Priprema cjepiva, cijepljenje i uzorkovanje seruma

Za pripremu cjepiva za roditeljsko jato teške pasmine Ross 308 korišteni su sojevi izdvojeni iz prethodnog jata iz istog objekta. Dostavljene lešine kokoši imale su znakove kolibaciloze s fibrinoznim poliserozitisom, salpingitisom i celulitisom i iz njih su bakteriološkom pretragom izdvojeni sojevi bakterije *Escherichia coli*, koji su potvrđeni MALDI TOF spektrometrom masa (Bruker Daltonics, Bremen, Njemačka). Nakon izdvajanja provedena je tipizacija izolata (CLERMONT i sur., 2013.) kako bi se u cjepivo uvrstilo različite sojeve izdvojene iz jata. Potom je iz izdvojenih sojeva pripremljeno autogeno cjepivo prema MELAMED i sur. (1991.) na način da su pojedini sojevi namnoženi u koncentraciji 5 i više McFarland-a, potom koncentrirani centrifugiranjem, isprani te razbijeni ultrazvukom i inaktivirani zagrijavanjem na 95 °C kroz jedan sat. Antigen je potom pomiješan s aluminij hidroksidom kao adjuvansom kod pripreme cjepiva za jato na farmi 1, a u kasnijih jata 2 i 3 s uljnim adjuvansom Montanide ISA 71 R VG (SEPPIC, Francuska) prema uputi proizvođača. Doza je prilagođena na  $5 \times 10^8$  bakterija/0,3 ml cjepiva po jedinki. Tako pripremljeno cjepivo primijenjeno je pilenkama i pijetlovima u dobi 9 i 19 tjedana. Za kontrolu imunskog odgovora na primijenjeno cjepivo uzeti su uzorci krvi i izdvojen serum neposredno prije cijepljenja te potom u tjednim intervalima od prvog do trećeg tjedna nakon cijepljenja, te u dobi 38 tjedana na farmi 1. Kao kontrolna skupina korišten je uzorak podrijetlom od necijepljenog jata u dobi 60 tjedana. U dvije naknadne farme, 2 i 3, jata su cijepljenja cjepivom s uljnim adjuvansom Montanide ISA 71 R VG (SEPPIC, Francuska). Na farmi 2 uzorci krvi su uzeti u dobi 17 tjedana prije drugog cijepljenja, te potom sa 35 tjedana, dok su na farmi 3 uzorci krvi uzeti u dobi 37 tjedana kod cijepljenog jata te u dobi 55, 62 i 67 tjedana kod necijepljenih jata.

### 3.2. Priprema ELISA kita

U svrhu ovog istraživanja, za određivanje titra specifičnih protutijela, izrađen je vlastiti ELISA kit načinjen od inaktiviranog antigena korištenog za izradu cjepiva prema LEITNER i sur. (1990.) na slijedeći način: ELISA mikrotitarske ploče inkubirane su preko noći s mješavinom *E.coli* sojeva razbijenih ultrazvukom u količini od  $5 \times 10^8$  bakterija u karbonatno-bikarbonatnom puferu u volumenu 200  $\mu$ L po jažici. Nakon inkubacije ploče su isprane tri puta puferom za ispiranje. Potom je testirani serum razrijeđen u omjeru 1:400 dodan u volumenu od 100  $\mu$ L po jažici u duplikatu. Nakon inkubacije od sat vremena na 37 °C ploča je isprana tri puta, a zatim su u svaku jažicu dodana protutijela protiv kokošnjih IgY protutijela podrijetlom od kunića konjugiranih s peroksidazom. Reakcija je inkubirana jedan sat na 37 °C, a potom je ploča isprana i dodan je supstrat. Nakon kratke inkubacije, reakcija je zaustavljena dodavanjem

lužine, te je određena apsorbanca pri 450 nm na spektrofotometru  $\mu$ Quant (Bio-Tek Instruments, SAD).

### **3.3. Statistička analiza**

Testirana je prvo normalnost raspodjele dobivenih rezultata Kolmogorov-Smirnov testom, a potom je značajnost razlika među skupinama testirana ANOVA LSD testom te Kruskal-Wallis testom primjenom računalnog programa Statistica 13 (Tibco, SAD).

## 4. REZULTATI

Rezultati analize ELISA titra specifičnih protutijela na APEC antigen primijenjen kokošima u autogenom cjepivu prikazani su Tablicom 1. te Slikama 1. do 3.

Na farmi 1 rezultati pokazuju značajan porast titra neposredno nakon primarne primjene cjepiva (Slika 1.) uz korištenje aluminij hidroksida kao adjuvansa, ali uz blagi pad nakon cijepjenja. Također i nakon buster doze primijenjene nakon 10 tjedana dolazi do značajnog porasta titra, ali ne značajno više od maksimuma postignutog nakon primarne primjene. Uočava se i značajan porast titra protutijela i u odnosu na starije necijepljeno jato dobi 60 tjedana. Također se uočava i postupan, a do 38. tjedna i značajan pad titra protutijela, ali ipak iznad kontrolnog starijeg jata (K).

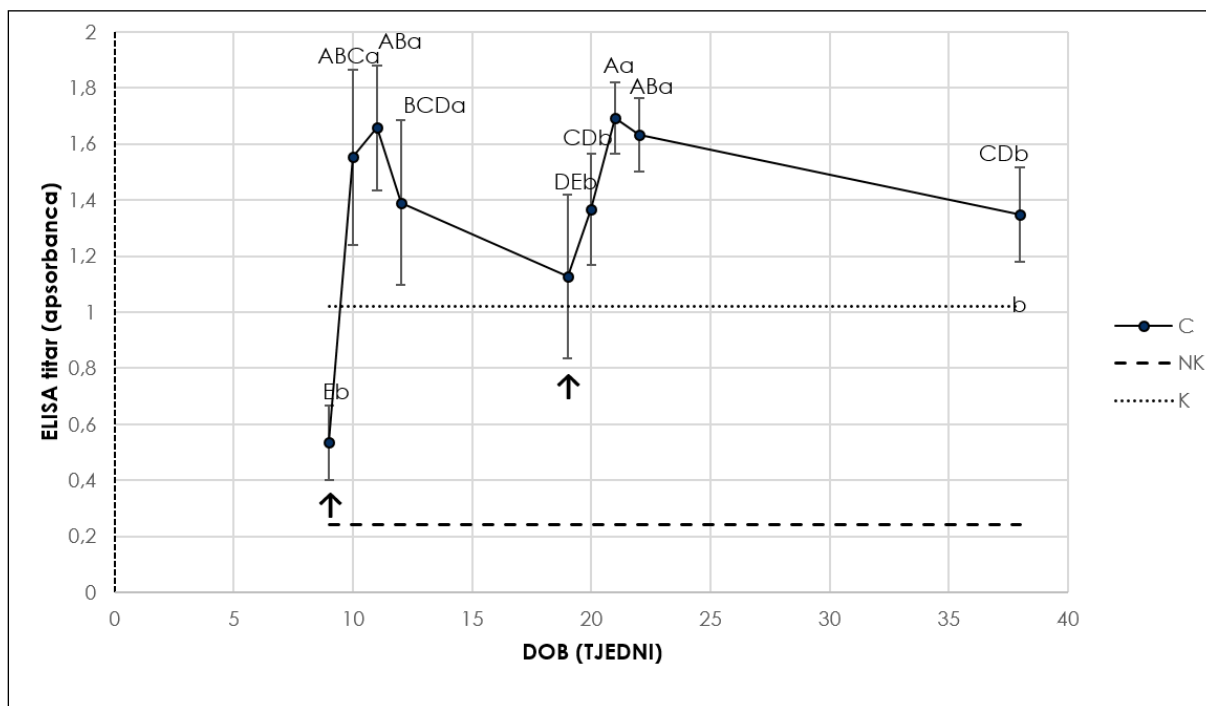
Kod jata na farmi 2 može se vidjeti značajan porast titra kod jata 1 u odnosu na jato u uzgoju dobi 17 tjedana, neposredno prije cijepjenja, dok porast titra kod jata 2 je vidno porastao, ali ne značajno (Slika 2.). Za pripremu je korišten uljni adjuvans kao i na farmi 3.

Na farmi 3. vidi se značajan porast titra kod jata 1 u odnosu na ostala necijepljena jata, ali i između necijepljenih jata postoje značajne razlike (Slika 3.).

Ono što je jasno vidljivo je u prosjeku gotovo dvostruko veći ELISA titar između necijepljenih i cijepjenih jata.

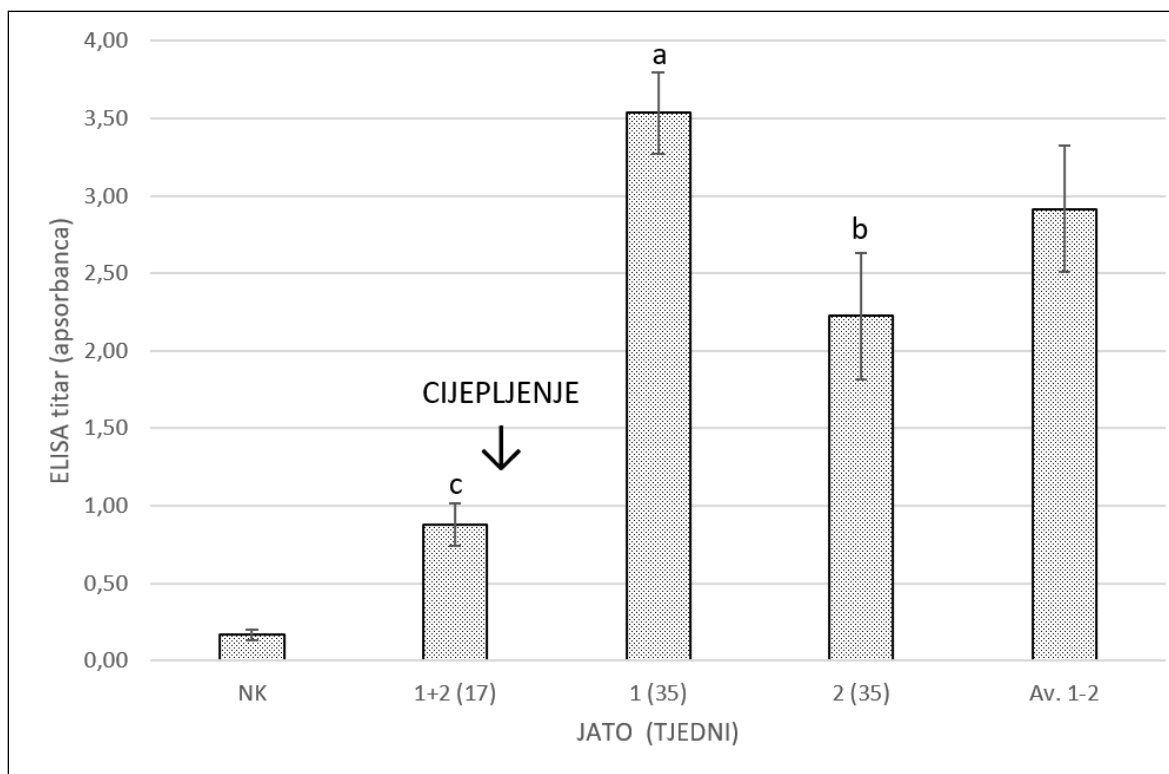
Tablica 1. Rezultati ELISA titra specifičnih protutijela za APEC sojeve u necijepljenim jatima (NC), te prije i nakon cijepjenja autogenim cjepivom (C) protiv APEC sojeva (srednja vrijednost  $\pm$  SD) (vrijeme cijepjenja označeno je sa \*). (NK-negativna kontrola, K-pozitivna kontrola)

FARMA 1		FARMA 2		FARMA 3	
JATO (dob)	ELISA apsorbanca (srednja vrijednost $\pm$ SD)	JATO (dob)	ELISA apsorbanca (srednja vrijednost $\pm$ SD)	JATO (dob)	ELISA apsorbanca (srednja vrijednost $\pm$ SD)
1 (9)*	0,53 $\pm$ 0,13	NK	0,17 $\pm$ 0,03	1 (37) C	4,85 $\pm$ 0,82
1 (10)	1,55 $\pm$ 0,31	1+2 (17)*	0,88 $\pm$ 0,14	2 (62) NC	3,05 $\pm$ 0,56
1 (11)	1,66 $\pm$ 0,22	1 (35)	3,53 $\pm$ 0,26	3 (67) NC	1,95 $\pm$ 0,81
1 (12)	1,39 $\pm$ 0,29	2 (35)	2,22 $\pm$ 0,41	4 (55) NC	2,60 $\pm$ 0,35
1 (19)*	1,13 $\pm$ 0,29	Av. 1-2	2,92 $\pm$ 0,74	Av. 2-4 NC	2,53 $\pm$ 0,75
1 (20)	1,37 $\pm$ 0,20			NK	0,10 $\pm$ 0,001
1 (21)	1,69 $\pm$ 0,13				
1 (22)	1,63 $\pm$ 0,13				
1 (38)	1,35 $\pm$ 0,17				
K	1,02 $\pm$ 0,28				
NK	0,24 $\pm$				

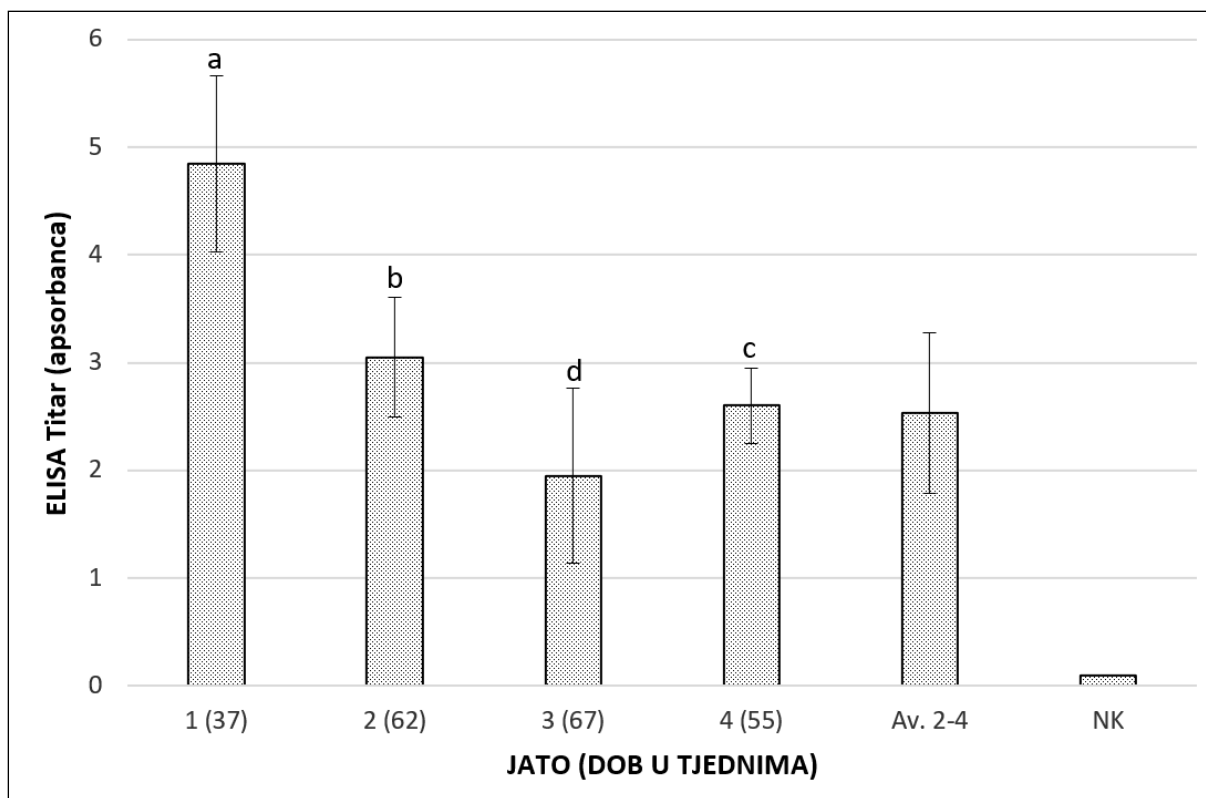


Slika 1. ELISA titar specifičnih serumskih protutijela za APEC antigen (srednja vrijednost  $\pm$  SD) na farmi 1. C - cijepljeno jato, K - necijepljeno jato, NK – SPF serum,  $\uparrow$  - termin cijepljenja autogenim cjepivom (različitim velikim slovima abecede (ABC) označene su statistički značajne razlike između tjedana unutar jata C, različitim malim slovima abecede (ab) označene su statistički značajne razlike između jata C i K)





Slika 2. ELISA titar specifičnih serumskih protutijela za APEC antigen (srednja vrijednost  $\pm$  SD) na farmi 2. Jato u uzgoju 1+2, dobi 17 tjedana, cijepljeno je s 19 tjedana, useljena u različite objekte 1 i 2 i kontrolirana u dobi 35 tjedana, NK – SPF serum,  $\uparrow$  - termin cijepljenja autogenim cjepivom (različitim malim slovima abecede (ab) označene su statistički značajne razlike između jata dobi 17 tjedana i jata 1 i 2)



Slika 3. ELISA titar specifičnih serumskih protutijela za APEC antigen (srednja vrijednost  $\pm$  SD) kod cijepjenog jata 1 i necijepjenih jata 2 do 4 na farmi 3. NK – SPF serum, (različitim malim slovima abecede (ab) označene su statistički značajne razlike između jata 1 do 4)

## 5. RASPRAVA

Kolibaciloza uzrokovana ptičjom patogenom *E.coli* pripada skupini bakterijskih infekcija u peradi s najvećom stopom pobola i smrtnosti. Činjenica da je bolest najčešće uzrokovana sa nekoliko APEC sojeva na farmi predstavlja veliki problem u dizajniranju učinkovitog cjepiva protiv kolibaciloze te iziskuje da svako cjepivo bude multivalentno kako bi bilo učinkovito. Osim cijepjenja, pokušani su i drugi pristupi u liječenju kolibaciloze kao što su uporaba antibiotika, zatim oralna primjena bakterijskih spora *Bacillus subtilis* koja nadmašuje *E. coli* i suzbija njezinu proliferaciju u crijevima pilića te uporaba *E. coli* bakteriofaga koji se prakticira u bolnicama kod proljeva dojenčadi (EBRAHIMI NIK i sur., 2018). Potreba za traženjem alternativnih metoda javila se ponajprije u nesilica konzumnih jaja gdje su propisi o reziduama i karenca ograničili antimikrobne pripravke na svega nekolicinu (KOUTSIANOS i sur., 2020). Međutim, pokazalo se da cijepjenje ipak nadmašuje druge postojeće pristupe. Ponajprije u pogledu učinkovitosti, sigurnosti i troškova (EBRAHIMI NIK i sur., 2018). Spektar zaštite, koja se postiže cijepljenjem, istraživali su u eksperimentalnim uvjetima brojni autori i na temelju provedenih istraživanja došli do zaključka da se gotovo potpuna zaštita postiže samo u slučaju infekcije s homolognim sojevima, a rijetko i kod infekcije s heterolognim sojevima. Razlog zašto je široku heterolognu zaštitu teško postići objašnjava se činjenicom da različiti čimbenici virulencije i njihove različite kombinacije mogu biti prisutni u različitim APEC sojevima dok su neki čimbenici virulencije prisutni i u apatogenim sojevima *E. coli*. Stoga se primjena autogenih cjepiva pokazala kao jedina i opravdana mjera, koja uz strogo poštivanje biosigurnosnih i tehnoloških mjera, omogućava da se perad zaštiti od zaraze koristeći vlastiti sustav obrane, bez rezidua i daljnjeg razvoja rezistencije (GOTTSTEIN i sur., 2019.). Na terenu se često koristi autogeno cijepjenje, ali je nedovoljno dokumentirano (KOUTSIANOS i sur., 2020).

Analizom različitih APEC programa cijepjenja kokoši pokazalo se kroz tri primarna ishoda (smrtnost, prosječni rezultat lezije i ponovna izolacija soja) da autogeno cijepjenje pruža značajno poboljšanje razine zaštite, bilo samostalno ili u kombinaciji s živim komercijalnim cjepivom. Autogena cjepiva mogu popuniti prazninu koju ostavlja ograničeni spektar komercijalno dostupnih cjepiva (KOUTSIANOS i sur., 2020). Landman i Eck (2017) pokazali su potpuni zaštitni učinak autogenih cjepiva protiv *E. coli* za sprečavanje sindroma *E. coli* peritonitisa (EPS) što je najvažniji uzrok uginuća kod kokoši nesilica. Međutim, zaštita nije dokazana nakon heterolognog izazivanja. Istraživanje provedeno u Egiptu pokazalo je

smanjenu smrtnost ptica izazvanih *E. coli* nakon cijepljenja autogenim cjepivom (El Jakee i sur., 2016.). Autogena cjepiva se često koriste u jatima tovnih pilića, pri čemu je autogeno cjepivo odgodilo klinički početak infekcije, a smrtnost ptica bila je najniža u skupini ptica cijepljenih dva puta (LI L, 2017.) KOUTSIANOS i sur. (2020.) navode da komercijalna živa (oslabljena) i inaktivirana cjepiva imaju ograničenu učinkovitost u kontekstu zaštite od heterolognih sojeva, te da je kombinacija obje vrste cjepiva u zajedničkom programu imunizacije obećavajući alat za ograničavanje utjecaja kolibaciloze na dobrobit, zdravlje i gospodarstvo u proizvodnji nesilica.

U ovom istraživanju pokazalo se da autogeno cjepivo potiče tvorbu specifičnih protutijela koja su osnova zaštite. Primjena aluminij hidroksida kao adjuvansa potiče nagli rast titra, ali on isto tako relativno brzo i opada. S druge strane, uljni adjuvans potiče visoke titreve protutijela, gotovo dvostruko više vrijednosti apsorbance, koji se dugo zadržavaju, što je utvrđeno na farmi 2 i 3. Upravo je perzistencija titra osnova zaštite autogenim cjepivom pri čemu kombinacija antigena i uljnog adjuvansa osigurava zaštitu životinja i u starijoj dobi, što potvrđuju i prethodna istraživanja (LANDMAN i VAN ECK, 2017.).

## 6. ZAKLJUČCI

Temeljem postignutih rezultata mogu se donijeti slijedeći zaključci:

1. Primjena autogenog cjepiva potiče značajan porast titra nakon cijepljenja.
2. Porast titra kod cijepljenih jata je u prosjeku dvostruko veći od necijepljenih starijih jata.
3. Korištenje adjuvansa na bazi aluminij hidroksida rezultira nešto nižim titrevima koji imaju bržu stopu opadanja.
4. Uljni adjuvansi osiguravaju više titreve koji imaju bolju perzistenciju.

## 7. POPIS LITERATURE

1. BIĐIN Z.: Bolesti peradi: Veterinarski fakultet: Zagreb, 2008.
2. CLERMONT, O., J. K. CHRISTENSON, E. DENAMUR, D. M. GORDON (2013): The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ. Microbiol. Rep.* 5(1), 58-65.
3. COLLINGWOOD C., KEMMETT K., WILLIAMS N., WIGLEY P. (2014): Is the concept of avian pathogenic *Escherichia coli* as a single pathotype fundamentally flawed? *Front. Vet. Sci.*, 1:5. <https://doi.org/10.3389/fvets.2014.00005>
4. DHAMA K., CHAKRABORTY S., BARATHIDASAN R., TIWARI R., RAJAGUNALAN S., SINGH S.D. (2013): *Escherichia coli*, an economically important avian pathogen, its disease manifestations, diagnosis and control, and public health significance: A review. *Res. Opin. Anim. Vet. Sci.*, 3(6), 179-194.
5. EBRAHIMI-NIK H., BASSAMI M.R., MOHRI M., RAD M., KHAN M.I. (2018): Bacterial ghost of avian pathogenic *E.coli* (APEC) serotype O78:K80 as a homologous vaccine against avian colibacillosis. *PLoS One.* 2018: 13(3).
6. EL JAKEE J.K., EL ARMY G.M., HESSAIN A.M., HEMEG H.A., SHAFEI S.M., MOUSSA I.M. (2016): Production and evaluation of autogenous vaccine against avian colibacillosis. *The Journal of Animal and Plant Sciences.* 26, 79-87.
7. EWERS C., ANTÃO E.M., DIEHL I., PHILIPP H.C., WIELER L.H. (2009): Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential. *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (1):184-192.
8. GOTTSTEIN Ž., HORVATEK TOMIĆ D., LUKAČ M., NEDELJKOVIĆ G., GALINDO MEDINA E.Z., PRUKNER-RADOVČIĆ E., LOZICA L., ČELEBIĆ I., VLAHEK M., DOLENČIĆ N., GLAVAK Ž., BANOVEC Z., VINDIŠ LJ. (2017): Cijepljenje protiv APEC sojeva *E.coli* primjenom autogenog cjepiva na roditeljskim farmama teške linije kokoši u Hrvatskoj. *Peradarski dani 2017, Zagreb, Hrvatska*, 61-66.
9. GOTTSTEIN Ž., LOZICA L., HORVATEK TOMIĆ D., LUKAČ M., PRUKNER-RADOVČIĆ E., VLAHEK M., DOLENČIĆ N., GLAVAK Ž. (2019): Proizvodni pokazatelji nakon primjene autogenog cjepiva protiv ptičjih patogenih sojeva *E.coli* i

poboljšanja programa cijepljenja u jatima teške linije kokoši. Zbornik Peradarski dani 2019, Prelog, Hrvatska, 98-103.

10. HELLER E.D., LEITNER H., DRABKIN N., MELAMED D. (1990): Passive immunisation of chicks against *Escherichia coli*. Avian Pathology. 19:2, 345-354.
11. JOHNSON J.R., SANNES M.R., CROY C., JOHNSTON B., CLABOTS C., KUSKOWSKI M.A., BENDER J., SMITH K.E., WINOKUR P.L., BELONGIA E.A. (2007): Antimicrobial drug-resistant *Escherichia coli* from humans and poultry products, Minnesota and Wisconsin, 2002–2004. Emerg. Infect. Dis. 13: 838–846.
12. KOUTSIANOS D., ATHANASIOU L., MOSSIALOS D., KOUTOULIS K. (2021): Colibacillosis in poultry: A disease overview and the new perspectives for its control and prevention. Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society 71(4): 2425-2436
13. KOUTSIANOS D., GANTELET H., FRANZO G., LECOUCPEUR M., THIBAUT E., CECCHINATO M., KOUTOULIS K.C. (2020): An assessment of the level of protection against colibacillosis conferred by several autogenous and/or commercial vaccination programs in conventional pullets upon experimental challenge. Veterinary Sciences. 2020: 7(3):80
14. KUNERT FILHO, H.C., BRITO, K.C.T., CAVALLI, L.S., BRITO, B.G. (2015) : Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) - an update on the control. U: The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Tehnological Advances and Educational Programs, (Méndez-Vilas, A., Ur.), Formatex Research Center, Badajoz (Spain), 598 – 618. str.
15. KUNERT FILHO H.C., CARVALHO D., GRASSOTTI T.T., SOARES B.D., ROSSATO J.M., CUNHA A.C., BRITO K.C.T., CAVALLI L.S., BRITO B.G. (2015): Avian pathogenic *Escherichia coli* – methods for improved diagnosis. World's Poultry Science Journal. 71 (02)
16. LANDMAN W.J.M., VAN ECK J.H.H. (2017): The efficacy of inactivated *Escherichia coli* autogenous vaccines against the *E. coli* peritonitis syndrome in layers. Avian Pathology. 46(6): 658-665.
17. LEITNER G., MELAMED D., DRABKIN N., DAN HELLER E. (1990): An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Escherichia coli*: Association between indirect hemagglutination test and survival. Avian Diseases 34: 58-62.

18. LI L., THØFNER I., CHRISTENSEN J.P., RONCO T., PEDERSEN K., OLSEN R.H. (2017): Evaluation of the efficacy of an autogenous *Escherichia coli* vaccine in broiler breeders. *Avian Pathology*. 46(3): 300-308.
19. LINDEN J. (2015): Colibacillosis in layers: an overview. The Poultry Site. <https://www.thepoultrysite.com/articles/colibacillosis-in-layers-an-overview>
20. LUTFUL KABIR S.M., (2010): Avian colibacillosis and salmonellosis: A closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 7(1): 89-114.
21. MELAMED D., LEITNER G., DAN HELLER E. (1991): A vaccine against avian colibacillosis based on ultrasonic inactivation of *Escherichia coli*. *Avian Diseases* 35: 17-22.
22. MELLATA M. (2013): Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: Infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. *Foodborne Pathog. Dis.* 10 (11), 916-932.
23. POULSEN L.L., KUDIRKIENE E., JØRGENSEN S.L., DJORDJEVIC S.P., CUMMINS M.L., CHRISTENSEN J.P., CHRISTENSEN H., BISGAARD M., THØFNER I. (2020) : Whole genome sequence comparison of avian pathogenic *Escherichia coli* from acute and chronic salpingitis of egg laying hens. *BMC Veterinary Research*. 2020: 16, 148.
24. SOLÀ-GINÉS M., CAMERON-VEAS K., BADIOLA I., DOLZ R., MAJÓ N., DAHBI G., VISO S., MORA A., BLANCO J., PIEDRA-CARRASCO N., GONZÁLEZ-LÓPEZ J.J., MIGURA-GARCIA L. (2015a): Diversity of multi-drug resistant avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) causing outbreaks of colibacillosis in broilers during 2012 in Spain. *PLoS One*. 2015: 10(11).
25. SOLÀ-GINÉS M., GONZÁLEZ-LÓPEZ J.J., CAMERON-VEAS K., PIEDRA-CARRASCO N., CERDÀ-CUELLAR M., MIGURA-GARCIA L. (2015b): Houseflies (*Musca domestica*) as vectors for extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* on Spanish broiler farms. *Appl. Environ. Microbiol.*: 81(11): 3604–3611.
26. SUN H., LIU P., NOLAN L.K., LAMONT S. J. (2015): Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) infection alters bone marrow transcriptome in chickens. *BMC genomics* 16, 690 (2015).



27. ŠIMPRAGA B. (2012): Bolesti peradi: Bakterijske bolesti: Kolibaciloza. U: Veterinarski priručnik, (Herak – Perković V., Grabarević Ž., Kos J., Ur.), Medicinska naklada, Zagreb, 1686–1688.

## 8. SAŽETAK

### **Praćenje titra specifičnih protutijela potaknutog autogenim cjepivom protiv APEC sojeva *E. coli* na roditeljskim farmama teške pasmine kokoši**

APEC sojevi (*Avian pathogenic Escherichia coli*) glavni su uzrok kolibaciloze u peradi. Nanose velike gospodarske štete uzrokujući visoki morbiditet i smrtnost pilića, tovnih i nesilica, a ujedno i proizvodi od peradi kontaminirani APEC sojevima predstavljaju opasnost za ljudsko zdravlje. Nadalje, pojava rezistentnih i multirezistentnih sojeva kao posljedica dugogodišnje raširene i prekomjerne uporabe antibiotika, uvelike je ograničila dostupnost učinkovitih antimikrobnih sredstava i samim time iziskivala traženje učinkovitijih opcija u smanjenju učestalosti pojave kolibaciloze kao i smanjenju gubitaka koje je ista prouzrokovala. Izrada i primjena autogenih cjepiva pokazala se kao vrlo učinkovita metoda u prevenciji ove bolesti. U ovom istraživanju, bakteriološkom pretragom iz dostavljenih lešina, izdvojeni su sojevi *E. coli* na farmi roditelja teške linije kokoši. Potom je provedena tipizacija izolata te je iz izdvojenih sojeva pripravljeno autogeno cjepivo i primijenjeno pilenkama i pijetlovima u dobi 9 i 19 tjedana. Za određivanje titra specifičnih protutijela, izrađena je ELISA načinjena od inaktiviranog antigena korištenog za izradu cjepiva. Rezultati ukazuju da se primjenom autogenog cjepiva potiče značajan porast titra nakon cijepjenja. Primjena aluminij hidroksida kao adjuvansa osigurava nagli porast ali i postupni pad titra. Uljni adjuvans osigurava dugotrajno zadržavanje visokog titra koji je kod cijepjenih jata u prosjeku dvostruko veći od necijepjenih starijih jata.

**Ključne riječi:** *E.coli*, APEC, autogeno cjepivo, roditelji teške linije kokoši

## 9. ABSTRACT

### **Monitoring of specific antibody titers induced by autogenous vaccine against APEC strains of *E. coli* in broiler parent flocks**

APEC strains (Avian pathogenic *Escherichia coli*) are the main cause of colibacillosis in poultry. They inflict major economic damage by causing high morbidity and mortality in chicks, broilers and laying hens. Also, chicken meat products contaminated with APEC present danger for human health. Appearance of resistant and multiresistant strains as a result of long term, excessive use of antibiotics, has widely limited attainability of effective antimicrobial substances and forced us to search for more effective options for reducing the incidence of colibacillosis and large economical loses caused by it. Production and administration of autogenous vaccines is a very effective method in disease prevention. In this research, microbiological monitoring of the delivered carcasses enabled isolation of *E. coli* strains in the broiler parent flock farms. After that, typing of the isolates was conducted and an autogenous vaccine was produced for vaccination of pullets and roosters at 9 and 19 weeks of age. For determining specific antibody titre, an ELISA test was made from inactivated antigen used for manufacturing of the vaccine. Results proved a significant titre increase after application of the autogenous vaccine. Application of aluminium hydroxide as adjuvant stimulated fast rise of the titre, but also a constant drop of titre. Oil adjuvant on the other hand stimulates long lasting titre which is double in values in vaccinated flocks compared to unvaccinated older flocks.

**Key words:** *E. coli*, APEC, autogenous vaccine, broiler parent flocks

## **10. ŽIVOTOPIS**

Rođena sam 6.5.1992. godine u Zagrebu. Pohađala sam Osnovnu školu "Kardinala Alojzija Stepinaca" u Krašiću. Nakon završene osnovne škole upisala sam srednju školu Zdravstveno učilište Zagreb, smjer medicinski kozmetičar. 2011. godine, po završetku srednje škole, upisujem Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija radila sam raznovrsne poslove u sklopu studentskog servisa. Terensko-stručnu praksu u trajanju od nekoliko mjeseci odradila sam 2017. godine u Veterinarskoj stanici Jastrebarsko te Savinjskoj veterinarskoj stanici u mjestu Žalec u Sloveniji. Temu diplomskog rada odabrala sam zbog interesa za bolesti peradi i perad općenito.