

DINAMIKA TITRA PROTUTIJELA PRIJE I NAKON PRIMJENE MS-H CJEPIVA U IMUNOPROFILAKSI BAKTERIJE *Mycoplasma synoviae* KOD JATA TEŠKE LINIJE KOKOŠI

Kolar, Matej

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:166293>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-29**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

Matej Kolar

**DINAMIKA TITRA PROTUTIJELA PRIJE I NAKON
PRIMJENE MS-H CJEPIVA U IMUNOPROFILAKSI
BAKTERIJE *Mycoplasma synoviae* KOD JATA TEŠKE LINIJE
KOKOŠI**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

Zavod za bolesti peradi s klinikom

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

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

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

Zahvala

Zahvaljujem se ovim putem mentoru izv. prof. dr. sc. Željku Gottsteinu na pomoći i savjetima pri izradi ovog diplomskog rada. Hvala Vam što ste mi bili mentor.

Veliko hvala i kolegama i prijateljima koji su mi pomogli prilikom studija, bilo to savjetima, posuđenim skriptama ili podukama.

Također se zahvaljujem svojim roditeljima i obitelji koji su me pogurali svaki puta kada bi zapeo i bili su neizmjerena podrška u mom osobnom i akademskom napretku.

A najveće hvala Martini koja je bila uz mene od prvog do zadnjeg dana studija i ostala stajati kroz dobra i loša vremena. Hvala ti na bezgraničnom strpljenju, vjeri i potpori.

Popis kratica

MS – Mycoplasma synoviae

MG – Mycoplasma gallisepticum

NAD – nikotinamid adenin dinukleotid

PCR – polymerase chain reaction

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay

SPA – serum plate agglutination test

IHA – inhibicija hemaglutinacije

Popis priloga

Tablice

Tablica 1: Vrijednosti titra specifičnih protutijela za bakteriju *Mycoplasma synoviae* u necijepljenog zaraženog jata (N) i cijepljenih jata (C1-C3).

Slike

Slika 1: Vrijednosti titra specifičnih protutijela za bakteriju *Mycoplasma synoviae* u necijepljenog zaraženog jata (N) i cijepljenih jata (C1-C3).

SADRŽAJ

1. UVOD	6
2. PREGLED LITERATURE	7
2.1. Mycoplasma synovia	7
2.1.1. Incidencija i distribucija	7
2.1.2. Prijenos	7
2.1.3. Inkubacija	8
2.1.4. Klinička slika	9
2.1.5. Patogeneza	10
2.1.6. Dijagnostika	10
2.1.7. Prevencija i kontrola	12
2.1.8. Ekonomski značaj	13
2.2. MS-H cjepivo	14
2.3. ELISA	15
2.3.1 Vrste ELISA testova	15
2.4. PCR	17
3. MATERIJALI I METODE	18
3.1. Monitoring i imunoprofilaksa bakterije <i>Mycoplasme synoviae</i>	18
3.2. Uzorkovanje seruma	18
3.3. Statistička obrada rezultata	18
4. REZULTATI	19
5. RASPRAVA	21
6. ZAKLJUČCI	23
7. LITERATURA	23
8. SAŽETAK	28
9. SUMMARY	29
10.ŽIVOTOPIS	30

1. UVOD

Mycoplasma synoviae (MS) je bakterija koja predstavlja potencijalni problem za mnoge uzgajivače peradi, poglavito farme kokoši. Pojava zaraze bakterijom MS na takvoj farmi može prouzročiti značajan pad proizvodnje i kvalitete jaja te smanjiti dnevni prirast što u konačnici dovodi do ekonomskih gubitaka i smanjenja rentabilnosti te proizvodnje. U svrhu suzbijanja pojave i širenja ove bolesti na farmama, razvijeno je niz cjepiva. Cjepivo s vrlo učinkovitom zaštitom je cjepivo s atenuiranim MS-H sojem. Specifičnost ovog soja je mogućnost rasta na nižoj temperaturi, na 35°C, koja je prisutna u gornjim dišnim prohodima. Na višoj temperaturi tijela propada što sprječava vertikalni prijenos. Primjenom MS-H cjepiva želi se kolonizirati predilekcijska mjesta za bakteriju MS sa manje virulentnim MS-H sojem kako bi se blokiralo vezanje divljeg soja. U ovom diplomskom radu opisano je istraživanje kojim se želi utvrditi razine titra protutijela nakon zaraze divljim sojevima i nakon cijepljenja MS-H sojem u teških linija kokoši.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. *Mycoplasma synoviae*

Ptičji patogen *Mycoplasma synoviae* (MS) član je razreda Mollicutes, skupine bakterija koju karakteriziraju male dimenzije, nedostatak stanične stjenke, kompleksne nutricionističke potrebe te sposobnost dugoročnog zadržavanja u domaćinu i izazivanja kroničnih infekcija (KLEVEN, 2018.). Zaraza bakterijom MS najčešće se javlja kao subklinička infekcija gornjeg dišnog trakta u kombinaciji sa newcastleskom bolesti, zaraznim bronhitisom i drugim zarazama dišnog sustava. Također, zaraza s bakterijom MS može postati sistemska bolest i rezultirati zaraznim sinovitisom (KLEVEN i FERGUSON-NOEL, 2008.). Uz navedeno, zadnjih desetak godina učestale su i promjene na ljusci kod nesilica što može značajno narušiti kvalitetu jaja (FABERWEE i sur., 2009).

2.1.1. Incidencija i distribucija

Zarazni sinovitis zabilježen je primarno kod peradi u fazi rasta, u dobi od 4 do 12 tjedana, najčešće u tovnih pilića. Zaraza s bakterijom MS česta je pojava u višedobnim jatima kokoši, pogotovo nesilica (MOHAMMED, 1986., OPTIZ, 1983.). Zbog navedenog je zaraza s bakterijom MS globalno raširena s incidencijom većom od 80% na farmama nesilica u Europi i Hrvatskoj (GOTTSTEIN i sur., 2021.).

2.1.2. Prijenos

Horizontalni prijenos se lako javlja pri direktnom kontaktu, pa je tako i često širenje između baterijskih kaveza. (OLSON i sur. 1964., OLSON i sur. 1967.) Iako mikoplazme kratko preživljavaju izvan domaćin, upravo višedobne farme osiguravaju stalno kruženje uzročnika među objektima i zadržavanje na farmi.

Prijenos bolesti odvija se preko dišnog trakta i uglavnom bude 100% zaraženost u jatu, ali samo mali broj kokoši razvije lezije po zglobovima.

Uzročnik kratko perzistira u okolini, što je pokazalo istraživanje sa jednodnevnim pilićima stavljenima u kontaminiranu okolinu, ali znakovi infekcije su se pojavili tek u dobi 33 do 54 dana starosti (MAROIS i sur., 2005.).

Ptice su doživotno zaražene i prenositelji ovog uzročnika. (KLEVEN i FERGUSON-NOEL, 2008)

Vertikalni prijenos javlja se kod prirodno i umjetno zaraženih kokoši (CARNAGHAN, 1961.), i ima bitnu ulogu u širenju bakterije MS u peradi. Stoga bi se sva jaja korištena za proizvodnju živih virusnih cjepiva trebala uzimati iz jata slobodnih od bakterije MS (VARDMAN, 1976.).

2.1.3. Inkubacija

Zarazni sinovitis primijećen je kod pilića dobi od šest dana, upućujući na to da je period inkubacije relativno kratak kod vertikalno zaraženih jedinki. Period inkubacije nakon horizontalnog širenja u pravilu traje 11 do 21 dan. Protutijela se mogu dokazati i prije nego što bolest postane klinički vidljiva. Kod jedinki koje su pokusno zaražene u dobi od 3 do 6 tjedana sa inokulumom koji sadrži eksudat iz zglobova zaražene peradi ili žumanjak zaraženih zametaka zabilježen je sljedeći redoslijed prijemljivosti i inkubacije: nožni jastučić, 2-10 dana; intravenski, 7-10 dana, intrakranijalno, 7-10 dana; intraperitonealno, 7-14 dana; intrasinusno, 14-20 dana; i aplikacija u konjuktivu, 20 dana.

Perad je također podložna i intrasmuskuarnoj inokulaciji. Intratrahelana inokulacija rezultirala je zarazom traheje i sinusa najranije 4 dana i učinkovito se širila na druge jedinke kontaktom. Lezije po zračnim vrećicama su na vrhuncu 17 do 21 dana nakon aplikacije aerosolom (KLEVEN i sur., 1972).

Zaključno, period inkubacije varira s titrom i patogenosti soja u inokulumu (KLEVEN i FERGUSON-NOEL, 2008.).

2.1.4. Klinička slika

Prvi znakovi kod jata zahvaćenog zaraznim sinovitisom su blijeda kresta, šepavost i poremećen rast. Kako bolest napreduje, perje postaje neuredno, a kresta se smanji. Otekline se obično pojavljuju oko zglobova, a učestali su i žuljevi po prsima. Skočni zglobovi i jastučići na stopalima su primarno uključeni, ali kod nekih ptica zahvaćena je većina zglobova; no povremeno su pronađene ptice sa generaliziranom zarazom, ali bez vidljivih otečenja zglobova. Ptice postaju bezvoljne, dehidrirane i mršave. Iako su jako zahvaćene bolešću, mnoge ptice nastavljaju jesti i piti ako su postavljene blizu hrane i vode. Zelena diskoloracija izmeta, koja sadrži velike količine urata čest je nalaz. Gore opisani akutni znakovi popraćeni su sporim oporavkom, no sinovitis može perzistirati doživotno kod jedinki u jatu. U drugim slučajevima, nema akutne faze ili nije primjetna, a može biti vidljiva kod samo nekoliko kronično zahvaćenih ptica u jatu. Kokoši zaražene preko dišnog trakta mogu pokazivati blagu hripavost za 4 do 6 dana ili mogu biti asimptomatske (MORROW i sur., 1997.). Upala zračnih vrećica može se javiti u bilo kojoj dobi i najčešće je primjećena kao razlog značajnih gubitaka kod tovnih pilića (KING, 1973.). U terenskim uvjetima, većina lezija zračnih vrećica uzrokovanih zarazom s bakterijom MS javljaju se tijekom zime. Potomstvo roditeljskih jata zaraženih bakterijom MS imaju predispoziciju razviti upalu zračnih vrećica, smanjeni prirast i smanjenu konverziju hrane (LOTT i sur., 1978.).

Dišni znakovi i lezije slične su onima kod bakterije *Mycoplasma gallisepticum* (MG), samo blažeg karaktera, i kao i kod MG, postoji sinergija s drugim uzročnicima dišnih zaraza, tj. česte su sekundarne zaraze (KLEVEN i sur., 1972.). Lezije dišnog trakta uzrokovane s bakterijom MG u početku poprimaju oblik viška mukoznog eksudata popraćenog kataralnim i kazeoznim eksudatom, koji mogu poprimiti amorfne mase u zračnim vrećicama (OIE, 2018.).

2.1.5. Patogeneza

Postoji značajna razlika između izolata u njihovoj sposobnosti da izazovu oboljenje; mnogi izolati izazivaju blage ili nikakve kliničke znakove (SENTIES-CUE, 2005.). Utvrđena je znatna promjenjivost u virulentnosti sojeva, no nisu pronađeni dokazi o selektivnom tropizmu prema epitelnim membranama donjeg dišnog trakta u odnosu na membrane zglobova, tetivnih ovojnica i burza (HINZ i sur., 2003.). Zaključeno je da patogenost uključuje vezanje i kolonizaciju gornjeg dišnog trakta plus dodatni neidentificirani faktori povezani uz sistemsku invaziju i stvaranje lezija. Sojevi bakterije MS izolirani iz zračnih vrećica skloniji su izazivanju upale zračnih vrećica, dok oni izolirani iz sinovijalnih ovojnica su sklonije izazivanju sinovitisa (KLEVEN i sur., 1975.). Lezije po zračnim vrećicama su znatno izraženije pri hladnim vremenskim uvjetima (YODER i sur., 1977.).

2.1.6. Dijagnostika

Dijagnoza zaraze bakterijom MS temelji se na dokazu patogena i/ili specifičnih protutijela. Dokaz MS patogena provodi se uzgojem u kulturi i/ili određivanjem vrsno specifičnih nukleinskih kiselina putem PCR metode. Za dokaz specifičnih MS protutijela koriste se postupci poput testa inhibicije hemaglutinacije (IHA), imunoenzimskog testa (ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay) i serumske aglutinacije (SPA-serum plate agglutination test) (KLEVEN, 2008b.; OIE, 2008.).

a) Uzgoj i identifikacija

Bakterija MS je relativno izbirljiv mikroorganizam koji zahtjeva medij bogat proteinima obično obogaćen serumom i serumskim faktorima (KLEVEN, 2008.). Ona fermentira glukozu koja se dodaje u medij za uzgoj, a zahtjeva dodatno i nikotinamid adenin dinukleotide (NAD) za rast (KLEVEN, 2008b.).

Sojevi MS otporni su na antibiotike koji utječu na sintezu stanične stijenke i djelomično na talij acetat. Penicilin (2,000 UI/ml) i talij acetat (do 1:2.000) se stoga dodaju u medij kako bi kontrolirali rast ostalih bakterija i kontaminaciju gljivicama (BRADBURY, 1998., OIE, 2008.).

Kolonijama bakterije MS obično treba 3 do 5 dana od inokulacije da postanu vidljive (KLEVEN, 2008b.).

Unatoč tome što se uzgoj smatra standardom u dijagnostici zaraze bakterijom MS, spor rast koji može potrajati i do 3 do 4 tjedna, često prerastanje podloge s nepatogenim mikoplazmama, te njezina izbirljiva priroda predstavljaju kritične prepreke za širu uporabu mikrobiološke metode dijagnostike MS u praksi (AHMED, 2016.).

b) Serološke metode

Najčešći serološki testovi koji se koriste u dijagnostici zaraze MS su SPA, IHA i ELISA (OIE, 2008.).

SPA test je jednostavan, brz i jeftin test za detekciju MS protutijela. Izvodi se miješanjem jednake količine testiranog uzorka seruma i obojanog MS antigena. Antigeni za MS komercijalno su dostupni. SPA test ima dostatnu osjetljivost jer najčešće dokazuje rano proizvedene imunoglobuline nakon infekcije, IgM protutijela. No, glavni nedostatak ovoga testa je niska specifičnost. Unakrižne reakcije između MS, nedavno cijepljenih ptica sa cjepivima na bazi uljnih emulzija, kao i sastojci medija korištenog u pripremi antigena najčešći su razlozi za pojavu lažno pozitivne reakcije pri provedbi SPA testova (GLISSON i sur. 1984., KLEVEN, 2008b., YODER, 1989.).

Primjena IHA testa je više specifična u usporedbi sa SPA testom, no neki drugi čimbenici ograničavaju njegovu širu uporabu poput utrošenog vremena i rada, a također i nedovoljna komercijalna dostupnost reagensa (KLEVEN, 2008b., KLEVEN i sur., 1988.). Jedna od glavnih nedostataka ove metode je niska osjetljivost jer može detektirati protutijela tek nakon trećeg tjedna od zaražavanja, jer IHA test dokazuje IgY, protutijela koja se produciraju kasnije (TALKINGTON i KLEVEN, 1983.).

ELISA test razvijen je kako bi se poboljšala osjetljivost IHA testa i specifičnost SPA testa, budući da ovim postupkom dokazujemo sva stvorena specifična protutijela. Pokraj mnogih komercijalno dostupnih ELISA kitova za dokaz bakterije MS, mogu se koristiti i „in house“ ELISA kitovi (HIGGINS i WHITHEAR, 1986., OPTIZ i sur., 1983.).

Načelno, visoka učestalost antigenih različitosti od strane MS izolata, unakrižne reakcije između MS, *Mycoplasma gallisepticum* (MG) i drugih patogena, smetnje sa cjepivima na bazi uljnih emulzija i nekim lijekovima su prijavljene kao razlozi za lažno pozitivne rezultate dobivene serološkim testovima (KLEVEN, 2008b.). Stoga su serološki testovi za MS predloženi tek za metode probiranja umjesto za definitivnu dijagnostiku. Jata sa pozitivnim serološkim rezultatima bi trebala biti potvrđena drugom metodom poput izolacije patogena i molekularnom detekcijom patogena (RAVIV i LEY, 2013.).

c) Molekularne metode

Uvođenje molekularnih metoda predstavljalo je bitan pomak u dijagnostici zaraze bakterijom MS. Preciznost, ušteda vremena i novčana isplativost molekularnih metoda učinilo ih je komplementarnima ili čak alternativama konvencionalnim metodama dijagnostike.

Lančana reakcija polimeraze (PCR-Polymerase chain reaction) predstavila se kao sigurnija, preciznija i primjenljivija alternativa prethodno korištenim metodama također izbjegavajući neke od njihovih štetnih nuspojava (AHMED, 2016.).

Dijagnostika bakterije MS PCR ili RealTime PCR metodom pokazala je 100% specifičnost uz procjenu osjetljivosti od 100 CFU-a (LAUERMAN i sur., 1993.). Usporedbom analize kliničkih uzoraka molekularna metoda može detektirati bakteriju MS u 17 uzoraka, dok klasična izolacija može dokazati MS u samo 7 od 27 uzoraka (MAROIS i sur., 2000.).

2.1.7. Prevencija i kontrola

Infekcije mikoplazmama šire se vertikalno (preko zaraženih jaja) kao i horizontalno (bliskim kontaktom, kontaminiranim česticama prašine, infektivnim aerosolom i kapljicama) i može perzistirati u jatu u subkliničkom obliku (FERGUSON-NOEL, 2020.).

Neke od metoda koje se koriste u sprječavanju širenja zaraze uključuju mjere biosigurnosti i upravljanja, liječenje i cijepljenje.

Cijepljenje:

Trenutno su komercijalno dostupna dva atenuirana cjepiva, temperaturno osjetljivo MS-H cjepivo i NAD neovisni MS1 sojevi (KREIZINGER, 2017.). Mutagenezom terenskog izolata iz Australije, odabran je živi temperaturno osjetljiv soj MS cjepiva MS-H koji je korišten i u ovom istraživanju (MORROW, 1998.). Cijepljenje se provodi okulonazalnom primjenom cjepiva ili raspršivanjem kako bi cjepni soj došao u gornje dišne prohode.

2.1.8. Ekonomski značaj

Mikoplazme mogu prouzročiti velike gubitke u peradarskoj industriji smanjenjem proizvodnje jaja, smanjenjem prirasta i konverzije hrane, smanjenjem kvalitete trupa, povećanjem smrtnosti, uz troškove cijepljenja i liječenja (KLEVEN, 2008.).

Abnormalnosti apeksa ljuske jaja (AAJ) karakterizirane su izmjenama na površini ljuske, stanjenom ljuskom, povećanom prozirnošću i pojavom napuklina i pukotina. Procijenjena srednja vrijednost ekonomskog gubitka jata u kojem je 5% jaja imalo AAJ u dobi od 30 do 75 tjedana starosti iznosi oko 3% bruto povrata cijene jaja (FEBERWEE i sur. 2009.). Osim promjena na ljuskama, zaraza sojevima MS uzrokuje prolaznu imunosupresiju, povećanu smrtnost 1 do 4% tovnih pilića te 5 do 10% smanjenu proizvodnju jaja i valivost kod nesilica i roditeljskih jata (NASCIMENTO i sur. 2005.).

Dodatni ekonomski teret bakterije MS također uključuje njeno praćenje i otkrivanje. Mikrobiološko izdvajanje je vremenski zahtjevna metoda koja zahtjeva više različitih medija. Serološke i molekularne metode su brže, no i cijene testova su više, uz viša početna ulaganja u opremu. No, za neke proizvođače, pogotovo uzgajivače, izbor može biti korištenje sve tri metode za potvrdu i sigurno otkrivanje, ali i vrijedan ulaganja uzevši u obzir gubitak npr. kod matičnog jata (JARQUIN, 2012.).

2.2. MS-H cjepivo

Budući da su kokoši doživotni nositelji uzročnika, farme s više dobnih skupina veoma je izazovno zadržati slobodne od MS. U takvim jatima cijepljenje se predstavlja kao najbolja mjera kontrole pojave i širenja ove bolesti, a kao najbolji izbor pokazalo se živo temperaturno osjetljivo MS-H cjepivo.

Nakon uspješno provedene mutageneze i stvaranja ts-11 soja od bakterije MG, Morrow i sur. (MORROW, 1998.) su primijenili isti postupak za proizvodnju temperaturno osjetljivog klona australskog izolata od bakterije MS kao procjenu za moguće cjepivo. Soj nazvan MS-H pokazao je ts⁺ fenotip, kolonizirao dušnik kokoši i potaknuo stvaranje serumskih protutijela 3 tjedna nakon inokulacije okulonazalno. Naknadno provedena istraživanja potvrdila su da je laboratorijski i komercijalno proizvedeno MS-H cjepivo učinkovito (MARKHAM, 1998a.) i sigurno (MARKHAM, 1998b.). Nakon okulonazalne primjene u purana, MS-H cjepivo koloniziralo je gornji dišni trakt i potaknulo mjerljiv odgovor protutijela, ali nije izazvalo lezije u dišnom traktu (NOORMOHAMMADI i sur. 2003.).

Prednosti i nedostaci MS-H cjepiva:

Prednosti:

- apatogena
- dugoročna stimulacija mukozne imunosti
- doživotna zaštita
- nema vertikalnog prijenosa
- veoma ograničen horizontalni prijenos
- potrebna jedna doza
- ne postaje virulentan
- može se razlikovati od ostalih terenskih sojeva

Nedostaci:

- okulonazalna primjena
- zamrznuto cjepivo
(potrebna stručnost)
- može izazvati odgovor
protutijela

Još jedna prednost MS-H cjepiva je temperaturna osjetljivost. To znači da je kolonizacija bakterije ograničena (na 39,5°C), a kokoš jedino treba zadržati normalnu tjelesnu temperaturu (41,5°C), ne mora biti imunokompetentna (CARGILL, 2016.).

2.3. Imunoenzimni test (ELISA)

ELISA ili imunoenzimni test jedna je od seroloških metoda dijagnostike koja se često koristi u veterinarskoj medicini. Može se koristiti za dokazivanje prisutnosti specifičnih protutijela, ali i za dokaz antigena. Ova metoda može biti kvantitativna ili kvalitativna.

Uvođenju ELISA metode u istraživanja prethodilo je otkriće da se topljivi antigen ili protutijela mogu vezati za čvrstu podlogu tako da se ne isperu puferiranom fiziološkom otopinom. U tu se svrhu rabe polistirenske mikrotitracijske ploče četvrtastog oblika koje obično imaju 96 (12 x 8) plitica (RUNJE i sur., 2006).

Reakcija ELISA temelji se na vezanju antitijela i antigena iz uzorka te spektrofotometrijskom mjerenju nastale reakcije, do koje dolazi zbog promjene boje. Ovom visoko osjetljivom i selektivnom metodom moguće je odrediti vrlo nisku koncentraciju analita od primjerice nekoliko ng po kg ispitivanog uzorka. (BUTORAC i sur. 2013.)

Sama metodologija ELISA metode uključuje imobilizaciju jedne ili dvije komponente, tj. antigena ili antitijela na čvrstu podlogu. To uklanja probleme separacije, s obzirom da nakon reakcije između vezane i nevezane komponente jedna komponenta ostaje pričvršćena na čvrstu podlogu, a ostatak se jednostavno uklanja pri čemu ostavlja vezani reaktant u obliku u kojem ga je moguće lako izmjeriti. Mjerenje predstavlja drugu veliku prepreku koja je obzirom na metodologiju riješena na način da se jedna komponenta, odnosno detektor antitijelo, obilježi s enzimom. Obilježena antitijela se tada mogu detektirati. Nakon dodatka supstrata za enzim, reakcija rezultira mjerljivim promjenama intenziteta obojenja. Imunoenzimski testovi dolaze u mnogim oblicima i imaju brojne primjene. Analitičarima su dostupni komercijalni testovi ili pak razvijaju specifične testove za svoje vlastite primjene (BONWICK i SMITH, 2004).

2.3.1. Vrste ELISA testova

Danas su razvijeni različiti tipovi ELISA testova zbog potrebe za većom specifičnošću testa prema sastojcima koji se određuju i koji mogu imati različitu kemijsku strukturu i svojstva, te radi dobivanja preciznijih rezultata u konačnici (AYDIN, 2015.). Postoji nekoliko vrsta tehnika

imunološkog određivanja pomoću ELISA testa: indirektna, "sendvič", konkurentna i nova višestruka i prijenosna metoda pomoću mikrotitarskih ploča (BUTORAC i sur., 2013).

U svrhu brže i efikasnije dijagnostike, razvijeni su ELISA kitovi sa unaprijed pripremljenim reagensima za provođenje testova, a kitovi korišteni u detekciji protutijela MS najčešće koriste indirektnu ELISA metodu.

Indirektna metoda:

Izvodi se u nekoliko koraka i služi za dokazivanje prisustva specifičnih protutijela u ispitujućem uzorku. U prvom koraku, u jažice se dodaje antigen. Antigen će se nespecifično vezati za polistiren i nakon ispiranja u jažice se dodaje otopina za blokiranje. Nakon ispiranja dodaje se uzorak koji bi mogao sadržavati specifična protutijela za adsorbirani antigen. Nakon ponovljenih ispiranja puferiranom otopinom s deterdžentom dodaju se sekundarna protutijela označena enzimom. Kada se višak sekundarnih protutijela ukloni ispiranjem dodaje se supstrat i nakon inkubacije reakcija se zaustavlja stop otopinom i slijedi očitavanje rezultata.

2.4. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Metoda lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) se koristi za dobivanje velikog broja kopija određenog dijela DNA kako bi se taj dio mogao koristiti za sekvenciranje, gel elektroforezu ili za razne druge eksperimente (ANONYMUS, 2021.).

Enzim koji se koristi kod PCR-a je Taq polimeraza, specifična DNA polimeraza izolirana iz bakterije *Thermus Aquaticus*. Uloga Taq polimeraze je stvaranje novih dijelova DNA koristeći postojeće kao predložak. Bakterija *Thermus Aquaticus* je termostabilna bakterija kojoj odgovaraju visoke temperature pa je zato Taq polimeraza pogodna za PCR budući da se umnažanje dijelova DNA odvija na visokim temperaturama (ANONYMUS, 2021.).

PCR se odvija u tri faze:

1. **Denaturacija** se odvija na temperaturi od 96°C koja omogućava razdvajanje dvolančane DNA u zasebne lance.
2. **Vezanje** se odvija na temperaturi od 55-65°C koja je pogodna za vezanje početnica na jednolančanu DNA.
3. **Produljenje lanca** se odvija na temperaturi od 72°C kako bi Taq polimeraza produljila početnice i sintetizirala novi lanac.

Ovaj se ciklus obično odvija 25 do 35 puta, ovisno o duljini DNA. Vizualizacija DNA nakon PCR-a obično se provodi gel elektroforezom. koja se bazira na provlačenju fragmenata DNA kroz gel koristeći električnu struju pa se fragmenti razdvajaju na osnovu veličine (ANONYMUS, 2021.).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Monitoring i imunoprofilaksa bakterije *Mycoplasma synoviae*

Na farmi kokoši roditeljskog jata hibrida teške linije Ross 308 su uočeni klinički i patomorfološki znakovi karakteristični za zarazu s bakterijom *Mycoplasma synoviae*. Provedena je serološka i molekularna dijagnostika te je potvrđeno prisustvo bakterije *Mycoplasma synoviae* u necijepljenom jatu (N). Slijedeća jata pilenki (C1-C3) u uzgoju cijepljena su cjepivom s MS-H sojem između 6 i 9 tjedna uzgoja.

3.2. Uzorkovanje seruma

U istraživanju su korišteni serumski porijeklom od krvi pilenki i kokoši različitih dobnih skupina (18 do 52 tjedna) uzetih s farme roditeljskog jata hibrida teške linije Ross 308. Pri uzorkovanju je uzeto od 30 do 48 uzoraka krvi po jatu, a izdvojeni serumski su do pretrage čuvani na -20°C .

Pretraga seruma na titar specifičnih protutijela za bakteriju *Mycoplasma synoviae* ELISA postupkom.

Serumi su pretraženi na titar specifičnih protutijela za *Mycoplasma synoviae* primjenom komercijalnog imunoenzimnog (ELISA) kita MS ELISA (BioChek, Reeuwijk, Nizozemska) prema uputama proizvođača. Optička gustoća je očitana pri 550 nm na spektrofotometru μQuant (Bio-Tek Instruments, SAD) te preračunata u titar sukladno uputama.

3.3. Statistička obrada rezultata

Rezultati su obrađeni statistički primjenom računalnog programa Statistica 13.5.0.17. (TIBCO Software Inc., SAD). Normalnost raspodjele je testirana Kolmogorov-Smirnov testom, a rezultati su analizirani Anova LSD testom uz razinu značajnosti $p \leq 0.05$.

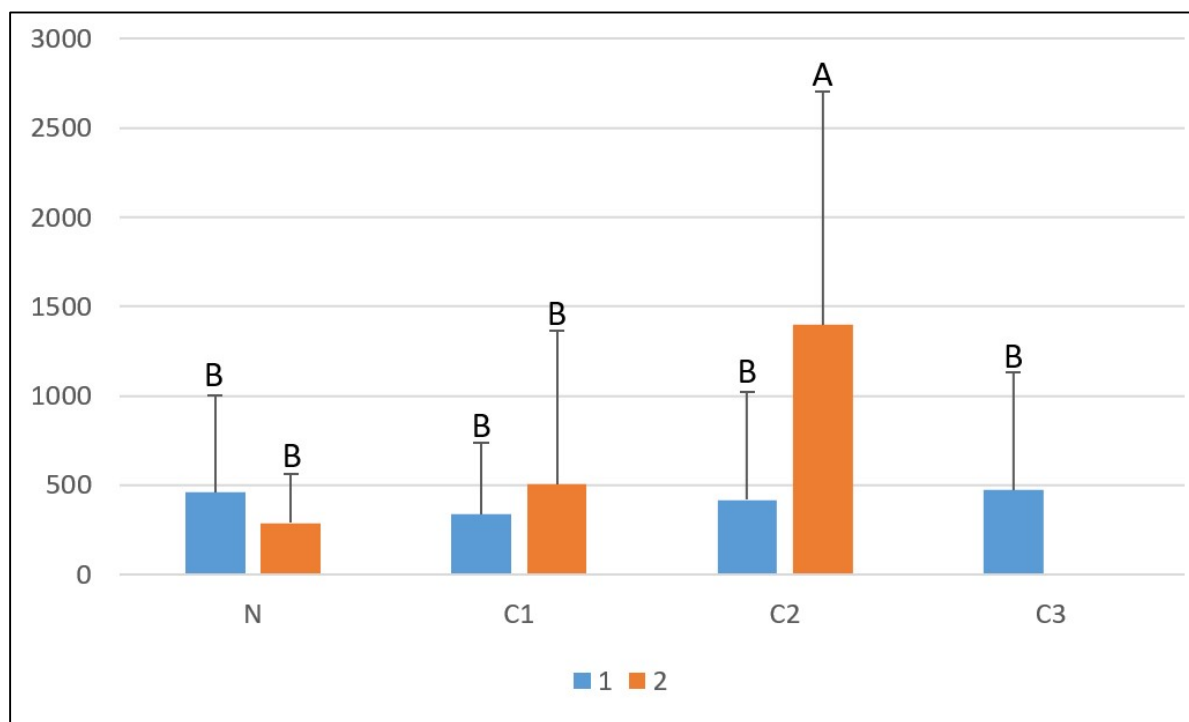
4. REZULTATI

Rezultati pretrage seruma na titar specifičnih protutijela za bakteriju *Mycoplasma synoviae* prikazani su Tablicom 1. i Slikom 1.

Titar protutijela kod necijepljenog zaraženog jata N ima vrlo niske titreve protutijela (Tablica 1.), no nazočnost bakterije je potvrđena molekularnom dijagnostikom. Udio pozitivnih seruma je relativno nizak, oko 30%. Do 40. tjedna prosječna vrijednost i udio pozitivnih se smanjio. Kod cijepljenih jata vrijednosti titra kod prvog uzorkovanja su niže ili nešto više od vrijednosti kod zaraženog jata, no kod drugog uzorkovanja kod drugog jata dolazi do značajnog porasta titra na 1400, uz značajan porast udjela pozitivnih seruma na 63%, uz najviši titar od 6451.

Tablica 1. Vrijednosti titra specifičnih protutijela za bakteriju *Mycoplasma synoviae* u necijepljenog zaraženog jata (N) i cijepljenih jata (C1-C3) (srednja vrijednost±SD)

UZORKOVANJE	JATA			
	N	C1	C2	C3
1	458±547 33 tj., 10/30 (30%)	339±399 24 tj., 5/30 (16,6%)	419±601 25 tj., 5/40 (12,5%)	472±659 18 tj., 9/40 (22,5%)
2	289±275 40 tj., 5/39 (12,8%)	504±862 52 tj., 12/48(25%)	1400±1306 41 tj., 19/30 (63%)	-



Slika 1. Vrijednosti titra specifičnih protutijela za bakteriju *Mycoplasma synoviae* u necijepljenog zaraženog jata (N) i cijepljenih jata (C1-C3) (srednja vrijednost±SD). Vrijednosti označene različitim velikim slovima abecede (A, B) se međusobno statistički značajno ($p \leq 0.05$) razlikuju.

5. RASPRAVA

Bakterija *Mycoplasma synoviae* može prouzročiti velike ekonomske štete uzgajivačima peradi. Zaraza jedinki ovom bakterijom često puta prođe neopaženo ili nepravilno dijagnosticirano zbog sekundarnih oboljenja koja uslijede nakon prvotnog izbijanja bolesti. Najznačajniji problemi koje uzrokuje su u vidu smanjene konverzije hrane, prirasta tovnih pilića, smanjenje kvalitete ljuske jaja i kvalitete trupa uslijed razvoja sekundarnih oboljenja.

Ptice koje su zaražene ovom bakterijom ostaju doživotni nositelji uzročnika i šire ga na ostale jedinke u jatu. To najčešće stvara probleme u jatima sa više dobih skupina između kojih se uzročnik tada lako širi i perzistira.

U takvim jatima neke od mjera biosigurnosti nisu uvijek primjenjive te cijepljenje predstavlja najbolju metodu zaštite jata. Cjepivo izbora je temperaturno osjetljivo atenuirano MS-H cjepivo dobiveno od istoimenog soja. Ono naseljava gornje dišne prohode jedinke i time sprječava naseljavanje drugih divljih patogenih sojeva poticanjem primarno lokalne zaštite.

Također potiče humoralni imuni odgovor i stvaranje protutijela koja sistemski štite organizam od zaraze divljim sojevima, a čiju smo razinu mjerili u ovom istraživanju koristeći komercijalne ELISA MS kitove za dokaz razine titra specifičnih protutijela u serumu.

Cilj istraživanja je bio utvrditi i usporediti titar protutijela kod jata zaraženog bakterijom MS (N) i kod cijepljenih jata (C1-C3). Očekivani titar protutijela kod cijepljenih jata kreće se u rasponu od 500 do 3000, uz dosta negativnih seruma, budući da humoralni odgovor nije dominantni način poticanja zaštite.

U N jatu je zabilježen neobično nizak titar protutijela, čija bi očekivana vrijednost trebala prelaziti preko 5000. Mogući razlog toga su slabije imunosno stanje testiranih jedinki. Pri ponovnom testiranju istog jata, bila je manja zastupljenost pozitivnih jedinki, kao i njihov titar protutijela što bi moglo upućivati na postepeni oporavak jata od zaraze.

Pri prvom testiranju uzoraka iz C1 jata zabilježene su vrijednosti titra ispod graničnih očekivanih vrijednosti (339 ± 399). No već pri drugom testiranju uzoraka, vrijednosti su porasle do minimalne granice ukazujući na slabiji ali dostatan imunosni odgovor jedinki (504 ± 862).

Kod C2 jata su prilikom prvog testiranja također zabilježe donje granične vrijednosti titra protutijela od oko 419 ± 601 . Pri drugom testiranju vrijednosti su pokazale značajan porast titra protutijela, i to do 1400. U sva četiri ispitivana jata, ovo je jedina zabilježena statistički značajna razlika. Zabilježeno odstupanje može biti razlog tome što je u jednom trenutku ovo jato, ispitano molekularnom dijagnostikom, bilo pozitivno i na divlji soj MS bakterije. Pri drugom testiranju je ujedno zabilježena i najveća učestalost pozitivnih uzoraka u ovom jatu 63%.

C3 jato je testirano samo jednom i dobiveni titar protutijela je također bio pri donjim granicama očekivanog titra protutijela: 472 ± 659 . Rezultati testiranja nisu značajno odstupali od vrijednosti dobivenih u ostalim jatima.

Porast titra protutijela u cijepljenim jatima upućuje na aktivnu i postojanu imunost koju potiče kolonija MS-H soja, dok kod N jata to nije slučaj zbog opadajućeg broja titra protutijela.

6. ZAKLJUČCI

Slijedom opisanih rezultata istraživanja valja zaključiti:

1. Nema značajne razlike u titru protutijela između jata inokuliranog MS bakterijom i cijepjenih jata u teške pasmine kokoši.
2. Lokalna imunost je osnova zaštite, dok niske razine humoralne imunosti ukazuju na neprobijanje zaštite divljim sojevima.
3. Zbog kronične zaraze bakterijom MS, uvijek su prisutni pozitivne jedinice u jatu uz postupan pad razine protutijela u serumu.

7. LITERATURA

1. ANONYMUS (2021): <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/polymerase-chain-reaction-pcr> pristupljeno: 10. 12. 2021
2. AHMED M. (2016): Epidemiological and Diagnostic Studies on *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* Originating from Poultry and Non-poultry Birds, 6-9.
3. BONWICK, G.A., SMITH, C.J. (2004): Immunoassays: their history, development and current place in food science and technology. Int. J. Food Sci. Tech. 39, 817-827.
4. BRADBURY, J.M., (1998). Recovery of mycoplasmas from Birds. Methods Mol Biol. 104: 45-51.
5. BUTORAC, A., MARIĆ, M., BADANJAK SABOLOVIĆ, M., HRUŠKAR, M., RIMAC BRNČIĆ, S., BAČUN DRUŽINA, V. (2013): Analitičke metode u forenzici hrane. Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition. 8, 90-101.
6. CARGILL, P. (2016): Vaccination against *Mycoplasma synoviae* using MS-H strain, live temperature sensitive vaccine. Pharmsure International Ltd., UK, <https://pharmsure.net/app/uploads/2016/12/Pharmsure-MSH-vaccine.pdf> , 1-12.
7. CARNAGHAN, R. B. A. (1961): Egg transmission of infectious synovitis. *J Comp Pathol* 71: 279–285.

8. FEBERWEE, A., J. J. DE WIT, W. J. LANDMAN (2009): Induction of eggshell apex abnormalities by *Mycoplasma synoviae*: field and experimental studies. *Avian Pathol.* 38, 77–85.
9. FERGUSON-NOEL N., ARMOUR NK, NOORMOHAMMADI AH, et al. (2020): Mycoplasmosis. *Dis Poult.* 2020;13:907–965.
10. GLISSON, J.R., DAWE, J.F., KLEVEN, S.H., (1984): The effect of oil-emulsion vaccines on the occurrence of nonspecific plate agglutination reactions for *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae*. *Avian Dis* 28, 397-405.
11. GOTTSTEIN, Ž., L. LOZICA, M. LUKAČ, D. VIDAS, A. HELL KUREVIJA, D. HORVATEK TOMIĆ (2021): Monitoring reveals high prevalence of *Mycoplasma synoviae* in layer flocks in Croatia. *Veterinarski arhiv* 91, in press.
12. HIGGINS, P.A., WHITHEAR, K.G., (1986): Detection and differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* antibodies in chicken serum using enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Dis* 30, 160-168.
13. HINZ, K. H., C. BLOME, and M. RYLL. (2003): Virulence of *Mycoplasma synoviae* strains in experimentally infected broiler chickens. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 116: 59–66.
14. JARQUIN R. and I. HANNING (2012). Comparison of Detection Methods for Mycoplasmas of Significance to the Poultry Industry, Serological Diagnosis of Certain Human, Animal and Plant Diseases, Dr. Moslih Al-Moslih (Ed.), ISBN: 978-953-51-0370-7, InTech.
15. KING, D. D., S. H. KLEVEN, D. M. WENGER, and D. P. ANDERSON. (1973): Field studies with *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis* 17: 722–726.
16. KLEVEN S.H., KING D.D. & ANDERSON D.P. (1972): *Airsacculitis* in broilers from *Mycoplasma synoviae*: effect on air-sac lesions of vaccinating with infectious bronchitis
17. KLEVEN, S. H., O. J. FLETCHER, and R. B. DAVIS. (1975): Influence of strain of *Mycoplasma synoviae* and route of infection on development of synovitis or airsacculitis in broilers. *Avian Dis* 19: 126–135.
18. KLEVEN, S.H., MORROW, C.J., WHITHEAR, K.G., (1988): Comparison of *Mycoplasma gallisepticum* strains by hemagglutination-inhibition and restriction endonuclease analysis. *Avian Dis* 32, 731-741.
19. KLEVEN, SH. (1998): Mycoplasmas in the etiology of multifactorial respiratory disease. *Poult Sci.* 1998;77:1146–9

20. KLEVEN SH. (2008): Control of avian mycoplasma infections in commercial poultry. *Avian Dis.* 2008; 52(3):367–374.
21. KLEVEN i FERGUSON-NOEL (2008): *Mycoplasma synoviae* infection// Diseases of poultry 12th edition/ uredio Saif Y.M. Ames: Blackwell Publishing, 2008. 845-856
22. KLEVEN, S.H., (2008b): Mycoplasmosis. In: A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens. 5th ed. L. Dufour-Zavala, D.E. Swayne, J.R. Glisson, J.E. Pearson, W.M. Reed, M.W. Jackwood, and P.R. Woolcock. Jacksonville, Florida. 59-64.
23. KREIZINGER Z, SULYOK KM, GROZNER D., et al. (2017): Development of mismatch amplification mutation assays for the differentiation of MS1 vaccine strain from wild-type *Mycoplasma synoviae* and MS-H vaccine strains. *PloS One.* 2017;12(4)
24. LAUERMAN, L.H., HOERR, F.J., SHARPTON, A.R., SHAH, S.M., van SANTEN, V.L., (1993): Development and application of a polymerase chain reaction assay for *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis* 37, 829-834.
25. LOCKABY, S. B., F. J. HOERR, L. H. LAUERMAN, B. F. SMITH, A. M. SAMOYLOV, M. A. TOIVIO KINNUCAN, and S. H. KLEVEN. (1999): Factors associated with virulence of *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis* 43:251–261.
26. LOTT, B. D., J. H. DROTT, T. H. VARDMAN, and F. N. REECE. (1978): Effect of *Mycoplasma synoviae* on egg quality and egg production of broiler breeders. *Poult Sci* 57: 309–311.
27. MARKHAM, J. F., MORROW, C. J., SCOTT, P. C., WHITHEAR, K. G. (1998): Safety of a temperature-sensitive clone of *Mycoplasma synoviae* as a live vaccine. *Avian Dis.* 42:677-681.
28. MARKHAM, J. F., MORROW, C. J., WHITHEAR, K. G. (1998): Efficacy of a temperature-sensitive *Mycoplasma synoviae* live vaccine. *Avian Dis.* 42:671-676.
29. MAROIS, C., DUFOUR-GESBERT, F., KEMPF, I., (2000): Detection of *Mycoplasma synoviae* in poultry environment samples by culture and polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 73, 311-318.
30. MAROIS, C., J. P. PICAULT, M. KOBISCH, and I. KEMPF. (2005): Experimental evidence of indirect transmission of *Mycoplasma synoviae*. *Vet Res* 36: 759–769.

31. MOHAMMED H. O., T. E. CARPENTER, R. YAMAMOTO, and D. A. McMARTIN. (1986): Prevalence of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* in commercial layers in southern and central California. *Avian Dis* 30: 519–26.
32. MORROW, C. J., J. M. BRADBURY, M. J. GENTLE, and B. H. THORP. (1997): The development of lameness and bone deformity in the broiler following experimental infection with *Mycoplasma gallisepticum* or *Mycoplasma synoviae*. *Avian Pathol* 26: 169–187.
33. MORROW, C. J., J. F. MARKHAM, and K. G. WHITHEAR. (1998): Production of temperature-sensitive clones of *Mycoplasma synoviae* for evaluation as live vaccines. *Avian Dis* 42: 667–670.
34. NASCIMENTO ER, PEREIRA VL, NASCIMENTO MG, BARRETO ML. (2005): Avian mycoplasmosis update. *Rev Bras Cienc Avic.*;7(1):1–9
35. NOORMOHAMMADI, A. H., JONES, J. F., HARRIGAN, K. E., WHITHEAR, K. G. (2003): Evaluation of the non-temperature-sensitive field clonal isolates of the *Mycoplasma synoviae* vaccine strain MS-H. *Avian Dis*. 47:355-360.
36. OIE, (2008): AVIAN MYCOPLASMOSIS. OIE Terrestrial Manual, 844-859, 482-496.
37. OLSON, N. O., H. E. ADLER, A. J. DaMASSA, and R. E. CORSTVET. (1964): The effect of intranasal exposure to *Mycoplasma synoviae* and infectious bronchitis on development of lesions and agglutinins. *Avian Dis* 8: 623–631.
38. OLSON, N. O., and K. M. KERR. (1967): The duration and distribution of synovitis-producing agents in chickens. *Avian Dis* 11: 578–585.
39. OPTIZ, H. M. (1983): *Mycoplasma synoviae* infection in Maine's egg farms. *Avian Dis* 27: 324-326.
40. OPTIZ, H.M., DUPLESSIS, J.B., CYR, M.J., (1983): Indirect micro-enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to *Mycoplasma synoviae* and *M. gallisepticum*. *Avian Dis* 27, 773-786.
41. RAVIV, Z., LEY, D.H., (2013): *Mycoplasma gallisepticum* infection. In: *Diseases of Poultry*, 13th Ed. Swayne DE. editor. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, pp 877–893.
42. RAZIN, S., HERRMANN, R., (2002): Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Kluwer Academic/Plenum, New York, 572
43. RUNJE, M, CVRTILA, T. (2006): ELISA u analitici hrane. *Meso*. 7, 92-94.

44. SENTIE-CUE, H. L. SHIVAPRASAD, and R. P. CHIN. (2005): Systemic *Mycoplasma synoviae* infection in broiler chickens. *Avian Pathol* 34: 137–142.
45. TALKINGTON, F.D., KLEVEN, S.H., (1983): A classification of laboratory strains of avian *Mycoplasma* serotypes by direct immunofluorescence. *Avian Dis* 27, 422-429.
46. VARDMAN, T. H. (1976): The resistance and carrier status of meattype hens exposed to *Mycoplasma synoviae*. *Poult Sci* 55: 268–273.
47. YODER, H. W., L. N. DRURY, and S. R. HOPKINS. (1977): Influence of environment on airsacculitis: Effects of relative humidity and air temperature on broilers infected with *Mycoplasma synoviae* and infectious bronchitis. *Avian Dis* 21: 195–208.
48. YODER H.W., Jr., (1989): Nonspecific reactions to *Mycoplasma* serum plate antigens induced by inactivated poultry disease vaccines. *Avian Dis* 33, 60-68.

8. SAŽETAK

DINAMIKA TITRA PROTUTIJELA PRIJE I NAKON PRIMJENE MS-H CJEPIVA U IMUNOPROFILAKSI BAKTERIJE *Mycoplasma synoviae* KOD JATA TEŠKE LINIJE KOKOŠI

Matej Kolar

Mycoplasma synoviae predstavlja jednu od prijetnji u peradarstvu na globalnoj razini budući da izaziva velike ekonomske gubitke. Primjena atenuiranog temperaturno osjetljivog MS-H cjepiva jedna je od učinkovitih biosigurnosnih mjera kojom bi izbjegli takve gubitke. Princip djelovanja MS-H cjepiva je kolonizacija gornjih dišnih puteva peradi sa manje patogenim sojem kako bi spriječili prihvaćanje divljih patogenih sojeva. U ovom diplomskom radu opisano je istraživanje kojim se utvrdila razina titra protutijela u kokoši teške pasmine nakon zaraze divljim sojem i nakon cijepljenja MS-H cjepivom. Između dvije skupine nije postojala značajna razlika u titru protutijela prilikom prvog testiranja. Nakon provedenog drugog testiranja zabilježeno je kako je kod kokoši zaraženih divljim sojem došlo do smanjenja titra protutijela, a kod kokoši cijepljenih MS-H cjepivom je porasta titar protutijela zbog mogućeg proboja zaštite. Rezultati istraživanja ukazuju na aktivnu imunost postignutu cijepljenjem.

Ključne riječi: *Mycoplasma synoviae*, MS-H, cijepljenje, titar protutijela, ELISA,

9. SUMMARY

DYNAMICS OF ANTIBODIES TITER BEFORE AND AFTER THE APPLICATION OF MS-H VACCINE IN IMMUNOPROPHYLAXIS OF THE BACTERIA *Mycoplasma synoviae* IN A BROILER PARENT FLOCK

Matej Kolar

Mycoplasma synoviae is one of the global threats in poultry industry as it causes large economic losses. The use of an attenuated temperature-sensitive MS-H vaccine is one of the effective protective measures to avoid such losses. The principle of action of the MS-H vaccine is the colonization of the upper respiratory tract of poultry with a less pathogenic strain to prevent the adherence of wild pathogenic strains. This thesis describes a study that determined the level of antibody titers in broiler breeder flocks after infection with wild-type strain and after vaccination with MS-H vaccine. There was no significant difference in antibody titer between the two groups during the first sampling. After conducting a second test, an antibody titer decreased in wild-type infected chickens, while increase in antibody titers occurred in chickens vaccinated with the MS-H vaccine, as probable result of wild type infection. The results of the study indicate active immunity achieved by vaccination.

Key words: mycoplasma synoviae, MS-H, vaccination, antibody titers, ELISE

10. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 27.12.1992. u Osijeku. Završio sam Isusovačku klasičnu gimnaziju s pravom javnosti u Osijeku i 2011. godine upisao Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija sam radio razne studentske poslove i isprobao razne sportove i rekreativne aktivnosti. Najviše me u konačnici privukao dodgeball s kojim se aktivno bavim od 2018. godine. Prilikom povratka iz Zagreba u Osijek sam pokrenuo vlastiti klub Dodgeball klub „Osijek“.