

UNIVERZITET U BEOGRADU

FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Pavle D. Gavrilović

**ISPITIVANJE UTICAJA  
ORNITHOBACTERIUM  
RHINOTRACHEALE NA POJAVU  
PATOMORFOLOŠKIH PROMENA U  
RESPIRATORNIM ORGANIMA  
BROJLERSKIH RODITELJA I  
FAZANA NAKON VEŠTAČKE  
INFEKCIJE**

doktorska disertacija

Beograd, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Pavle D. Gavrilović

**EXAMINATION OF THE INFLUENCE OF  
ORNITHOBACTERIUM  
RHINOTRACHEAE ON THE  
APPEARANCE OF  
PATHOMORPHOLOGICAL LESIONS  
IN RESPIRATORY ORGANS OF  
BROILER BREEDERS AND  
PHEASANTS AFTER EXPERIMENTAL  
INFECTION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013.



**Mentor:**

**dr Milijan Jovanović, redovni profesor,**  
**Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine,**  
**Katedra za patološku morfologiju**

**Članovi komisije:**

**dr Milijan Jovanović, redovni profesor,**  
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine,  
Katedra za patološku morfologiju

**dr Ružica Ašanin, redovni profesor u penziji,**  
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine,  
Katedra za mikrobiologiju sa imunologijom

**dr Vojin Ivetić, viši naučni saradnik,**  
Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd,  
Odeljenje za patološku morfologiju

**Datum odbrane:**

# ISPITIVANJE UTICAJA ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHEALE NA POJAVU PATOMORFOLOŠKIH PROMENA U RESPIRATORNIM ORGANIMA BROJLERSKIH RODITELJA I FAZANA NAKON VEŠTAČKE INFEKCIJE

## REZIME

Prvi podaci o oboljenju prouzrokovanom *O. rhinotracheale* datiraju iz 1991. godine kada je u južnoj Africi, Jan du Preez (Žan di Prez) otkrio novo oboljenje brojlera koje se manifestovalo blagim respiratornim simptomima. Bakteriološkim ispitivanjem organa obolelih brojlera otkrivena je gram-negativna, pleomorfna, štapićasta bakterija, sporog rasta, koja se nije mogla identifikovati kao neka od poznatih bakterijskih vrsta. Današnji naziv *Ornithobacterium rhinotracheale* prihvaćen je 1994. godine, kada je izvršena i klasifikacija uzročnika. Prema podacima iz literature infekcija *O. rhinotracheale* dovodi do značajnih ekonomskih gubitaka u živinarskoj proizvodnji koji su posledica povećanog mortaliteta, suprimiranog rasta, smanjene proizvodnje jaja i odbacivanja trupova na klanici. U literaturi ima veoma malo podataka o kliničkoj slici kod brojlerskih roditelja, dok podaci o patomorfološkim promenama ne postoje. Prema navodima iz literature *O. rhinotracheale* je izolovan iz nekoliko različitih vrsta divljih ptica, ali nema podataka o ornitobakteriozi fazana. Zbog toga su sprovedena ispitivanja imala za cilj da se utvrdi uticaj *O. rhinotracheale* na razvoj patomorfoloških promena u respiratornim organima i zdravstveno stanje kokoši brojlerskih roditelja i fazana iz odgoja.

Za eksperiment je odabrano 22 fazana starosti 19 nedelja i 22 kokoši brojlerskih roditelja hibrida „Ross 308“ starosti 15 nedelja. Ptice su podeljene u četiri grupe koje su držane na podnom sistemu, u odvojenim prostorijama. Nakon sedmodnevne aklimatizacije, inficirana je po jedna grupa od 16 fazana i 16 brojlerskih roditelja intratrahealnom aplikacijom suspenzije 48-časovne kulture *O. rhinotracheale*, soj B3263/91 u sterilnom fiziološkom rastvoru, u koncentraciji od  $5 \times 10^{11}$  CFU/ml. Po jedna grupa od šest fazana i šest brojlerskih roditelja služile su kao kontrolne grupe kojima je intratrahealno aplikovan po 1 ml sterilnog fiziološkog rastvora. Posle inficiranja ptice su svakodnevno opservirane i merena im je telesna masa neposredno pre inficiranja i sedam dana kasnije. Sedmog dana od inficiranja eutanazirano je po šest ptica iz inficiranih i četiri ptice iz kontrolnih grupa, intravenskom aplikacijom preparata „T61“ proizvođača Intervet. Dvanaestog dana od inficiranja eutanazirane su po četiri

ptice iz inficiranih i dve ptice iz kontrolnih grupa. Neposredno pre eutanazije uzorkovana je krv za serološki pregled, punkcijom brahijalne vene. Leševi eutanaziranih ptica su obdukovani i uzorkovani su unutrašnji organi za bakteriološko i histopatološko ispitivanje. Od preostalih inficiranih ptica (6 brojerskih roditelja i 6 fazana) uzorkovana je krv na svake dve nedelje u periodu do 16 nedelja i ispitivana metodom ELISA kako bi se utvrdio serološki odgovor na uzročnika. Uzorci organa ptica: nosnih šupljina, infraorbitalnih sinusa, larinksa, traheje, pluća, srca, slezine, jetre, bubrega i brisevi vazdušnih kesica ispitani su bakteriološki, metodom izolacije i identifikacije uzročnika. Za histopatološko ispitivanje uzorkovani su tkivni isečki nosne šupljine, infraorbitalnih sinusa, larinksa, traheje, pluća i vazdušnih kesica koji su fiksirani u 10% puferizovanom formalinu. Nakon obrade u automatskom tkivnom procesoru uzorci su kalupljeni u parafinske blokove. Parafinski isečki debljine oko 5 µm bojeni su standardnom hematoksilin-eozin metodom (HE).

Kod veštački inficiranih kokoši brojerskih roditelja nije utvrđen nepovoljan uticaj uzročnika na zdravstveno stanje. Eksperimentom je potvrđeno da kod kokoši brojerskih roditelja infekcija *O. rhinotracheale* protiče supklinički i da nema nepovoljan uticaj na prirast. Patoanatomske promene kod veštački inficiranih kokoši brojerskih roditelja manifestovale su se u respiratornim organima u vidu blagog kataralnog zapaljenja gornjih disajnih puteva: nosnih šupljina, larinksa, traheje i hiperemijom pluća kod 20% inficiranih kokoši. Histopatološke promene kod veštački inficiranih kokoši brojerskih roditelja najčešće su bile zastupljene u plućima (50%), traheji (40%), larinksu (20%), vazdušnim kesama (20%), nosnim šupljinama (10%) i infraorbitalnim sinusima (10%). Manifestovale su se u vidu kataralnog zapaljenja gornjih respiratornih organa i hiperemijom pluća. Dominantnu ćelijsku populaciju u inflamatornom infiltratu predstavljali su heterofili. *Ornithobacterium rhinotracheale* soj B3263/91 nije bilo moguće reizolovati iz organa kokoši brojerskih roditelja, komercijalnog hibrida „Ross 308“, sedam do dvanaest dana posle eksperimentalnog inficiranja u starosti od šesnaest nedelja.

Veštačka infekcija *O. rhinotracheale* sojem B3263/91 imala je nepovoljan uticaj na prirast fazana. Patoanatomske promene kod veštački inficiranih fazana manifestovale su se u respiratornim organima u vidu kataralnog zapaljenja gornjih disajnih puteva: nosnih šupljina, infraorbitalnih sinusa, larinksa i traheje, kao i hiperemijom pluća i aerosakulitisom. Histopatološke promene kod veštački inficiranih fazana najčešće su otkrivene u plućima (70%), larinksu (50%), traheji (50%), nosnim

šupljinama (40%), infraorbitalnim sinusima (30%) i vazdušnim kesama (30%). Promene su se manifestovale u vidu kataralnog zapaljenja gornjih respiratornih puteva, a dominantnu ćelijsku populaciju u inflamatornom infiltratu predstavljali su heterofili. *Ornithobacterium rhinotracheale* soj B3263/91 reizolovan je iz respiratornih organa fazana: infraorbitalnih sinusa, larinksa, traheje i pluća, sedam do dvanaest dana posle veštačkog inficiranja u starosti od dvadeset nedelja. Iz ostalih unutrašnjih organa uzročnik nije izolovan.

Serološki odgovor kod veštački inficiranih kokoši brojlerskih roditelja i fazana odlikovao se brzim stvaranjem specifičnih antitela za uzročnika koja su dostigla maksimalan nivo u krvi, u prvoj nedelji posle veštačkog inficiranja. Vrednosti titra antitela su postepeno opadale i održavale se na stabilnom nivou do dvanaeste nedelje od inficiranja, a nakon četrnaest nedelja od inficiranja specifična antitela više se nisu mogla otkriti metodom ELISA.

Fazani su se pokazali osetljivijim na veštačku infekciju *O. rhinotracheale* sojem B3263/91 od kokoši brojlerskih roditelja komercijalnog hibrida „Ross 308“.

**Ključne reči:** *Ornithobacterium rhinotracheale*, brojlerski roditelji, fazani, patomorfološke promene, respiratorni organi

**Naučna oblast:** Klinička patologija i terapija životinja

**Uža naučna oblast:** Patološka morfologija

**UDK broj:** 619:616

**EXAMINATION OF THE INFLUENCE OF ORNITHOBACTERIUM  
RHINOTRACHEALE ON THE APPEARANCE OF  
PATHOMORPHOLOGICAL LESIONS IN RESPIRATORY ORGANS  
OF BROILER BREEDERS AND PHEASANTS AFTER  
EXPERIMENTAL INFECTION**

**SUMMARY**

The first data relating to disease caused by *O. rhinotracheale* originate from 1991, when Jan du Preez discovered a new disease in broiler chickens in South Africa, which manifested itself with mild respiratory symptoms. Bacteriological examination of infected birds' organs revealed a gram-negative, pleomorphic, slow growing, rod bacterium, which could not be identified as any of the known bacterial species. The present name *Ornithobacterium rhinotracheale* was accepted and the agent was classified in 1994. The literature states that the *O. rhinotracheale* infection can cause significant economic losses in the poultry industry as a consequence of increased mortality, suppressed growth, reduced egg production and increased carcass condemnation rate at processing. There are few data about clinical features in broiler breeders nor can data about the gross lesions be found in the literature. According to the literature, *O. rhinotracheale* has been isolated from several different wild bird species, but there are no data relating to ornithobacteriosis in pheasants. For these reasons investigations were carried out to determine the influence of *O. rhinotracheale* on the development of pathomorphological lesions in the respiratory organs and on the health status of broiler breeders and pheasants from the rearing stage.

A total of 22 pheasants, 19 weeks of age and 22 "Ross 308" broiler breeder hens, 15 weeks of age were used in this study. The birds were divided into four groups which were housed in a floor system, in separate rooms. After seven days of acclimatization, one group of 16 pheasants and 16 broiler breeder hens were infected intratracheally with a suspension of 48-hour culture of *O. rhinotracheale* strain B3263/91 in sterile saline in concentration of  $5 \times 10^{11}$  CFU/ml. Six pheasants and six broiler breeders served as control groups and were inoculated intratracheally with 1 ml of sterile saline per bird. After infection, the birds were observed daily and weighed at the time of infection and seven days post-inoculation. On the seventh day post-inoculation, 6 birds from infected groups, and 4 birds from control groups were euthanized by intravenous application of the euthanasia drug "T61" produced by Intervet. On the twelfth day post-inoculation, 4

birds from infected groups and two birds from control groups were euthanized. Immediately prior to euthanasia, blood samples were taken for serological examination by a puncture, from the brachial vein. The euthanized birds were autopsied and the internal organs were sampled for bacteriological and histopathological examination. Blood samples from the remaining infected birds (6 broiler breeders and 6 pheasants) were taken every two weeks, for up to 16 weeks, and tested by ELISA to determine the serological response to the agent. Samples of the birds' organs: nasal cavities, infraorbital sinuses, larynx, trachea, lungs, heart, spleen, liver, kidneys and swabs of the air sacs were processed for bacteriological isolation and identification. For histopathological examination tissue samples of nasal cavities, infraorbital sinuses, larynx, trachea, lungs and air sacs were taken and fixed in 10% buffered formalin. After processing in an automated tissue processor the samples were embedded in paraffin blocks. Approximately 5 µm thick paraffin sections were stained using the standard hematoxylin-eosin method (HE).

It was not determined that the agent had a negative effect on the health condition of the experimentally infected broiler breeder hens. The experiment confirmed that *O. rhinotracheale* infection in broiler breeder hens runs in subclinical form and does not influence the growth rate. In experimentally infected broiler breeder hens, gross lesions were manifested in the respiratory organs in the form of a mild catarrhal inflammation of the upper respiratory tract: nasal cavities, larynx, trachea, and hyperemia of the lungs in 20% of infected hens. Histopathological lesions in experimentally infected broiler breeder hens were most frequently detected in the lungs (50%), trachea (40%), larynx (20%), air sacs (20%), nasal cavities (10%) and infraorbital sinuses (10%). The lesions were manifested in the form of catarrhal inflammation of the upper respiratory tract and lung hyperemia. The predominant cell population in the inflammatory infiltrate were heterophils. *Ornithobacterium rhinotracheale* strain B3263/91 could not be reisolated from „Ross 308“ broiler breeder hens, 7 to 12 days after experimental infection at the age of 16 weeks.

The experimental infection with *O. rhinotracheale* B3263/91 strain had a negative effect on the growth rate of pheasants. Gross lesions in experimentally infected pheasants were manifested in the respiratory organs in the form of catarrhal inflammation of the upper respiratory tract: nasal cavities, infraorbital sinuses, larynx and trachea, hyperemia of the lungs and aerosacculitis. Histopathological lesions in experimentally infected pheasants were most frequently detected in the lungs (70%),

larynx (50%), trachea (50%), nasal cavities (40%), infraorbital sinuses (30%) and air sacs (30%). They were manifested in the form of catarrhal inflammation of the upper respiratory tract, with heterophils as a predominant cell population in the inflammatory infiltrate. *Ornithobacterium rhinotracheale* strain B3263/91 was reisolated from the following respiratory organs of pheasants: infraorbital sinuses, larynx, trachea and lungs, 7 to 12 days after experimental infection at the age of 20 weeks. The agent could not be isolated from other internal organs.

The serological response in experimentally infected broiler breeders and pheasants was characterized by rapid production of specific antibodies that reached a maximum level in the blood in the first week after experimental infection. The antibody titers decreased gradually and were maintained at a stable level until the twelfth week after inoculation. Fourteen weeks post-inoculation specific antibodies could not be detected by ELISA.

The investigations was demonstrated that pheasants are more sensitive to experimental infection with *O. rhinotracheale* B3263/91 strain than broiler breeder hens of commercial hybrid “Ross 308”

**Key words:** *Ornithobacterium rhinotracheale*, broiler breeders, pheasants, pathomorphological lesions, respiratory organs

**Scientific field:** Clinical Pathology and Therapy of Animals

**Field of academic expertise:** Pathological Morphology

**UDK number:** 619:616

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. PREGLED LITERATURE.....</b>	<b>3</b>
2.1. Respiratorne bolesti ptica.....	3
2.2. Istorijat.....	4
2.3. Etiologija.....	7
2.3.1. Klasifikacija.....	7
2.3.2. Morfološke osobine.....	7
2.3.3. Kulturelne osobine.....	7
2.3.4. Biohemijske osobine.....	8
2.3.5. Osetljivost na hemijske agense.....	9
2.3.6. Serotipovi i sojevi.....	10
2.4. Domaćini.....	10
2.5. Putevi prenošenja.....	10
2.6. Patogeneza.....	11
2.7. Inkubacioni period.....	14
2.8. Klinička slika.....	14
2.8.1. Klinička slika kod brojlera.....	15
2.8.2. Klinička slika kod brojlerskih roditelja.....	15
2.8.3. Klinička slika kod komercijalnih nosilja.....	16
2.8.4. Klinička slika kod ćuraka.....	16
2.8.5. Klinička slika kod roditeljskih ćuraka.....	16
2.9. Patoanatomske promene.....	17
2.10. Histopatološke promene.....	19
2.11. Laboratorijska dijagnoza.....	20
2.11.1. Detekcija bakterija.....	21
2.11.2. Izolacija.....	22
2.11.3. Identifikacija.....	22
2.11.4. Tipizacija izolata.....	23
2.11.5. Serološka ispitivanja.....	24
2.11.6. Diferencijalna dijagnoza.....	25
2.12. Pojava infekcije u pojedinim zemljama.....	26
2.13. Serološka ispitivanja prisustva uzročnika u pojedinim zemljama.....	32
2.14. Eksperimentalna infekcija.....	33
2.14.1. Eksperimentalna infekcija pilića.....	33
2.14.2. Eksperimentalna infekcija ćuraka.....	35
2.14.3. Eksperimentalna infekcija pilića i ćuraka.....	37
2.14.4. Eksperimentalna infekcija prepelica ( <i>Coturnix coturnix japonica</i> ).....	38
2.15. Terapija.....	39
2.16. Vakcinacija.....	40
<b>3. CILJ I ZADACI ISPITIVANJA.....</b>	<b>42</b>
<b>4. MATERIJAL I METODE ISPITIVANJA.....</b>	<b>43</b>



4.1. Materijal.....	43
4.1.1. Ptice u eksperimentu.....	43
4.1.2. Bakterijski soj.....	45
4.1.3. Priprema bakterijske kulture za eksperimentalnu infekciju.....	45
4.1.4. Inokulacija bakterijske kulture.....	45
4.1.5. Opservacija.....	45
4.1.6. Uzorkovanje.....	46
4.2. Metode.....	46
4.2.1. Serološko ispitivanje.....	46
4.2.2. Bakteriološko ispitivanje.....	47
4.2.3. Histopatološko ispitivanje.....	49
4.2.4. Statistička obrada podataka.....	49
<b>5. REZULTATI.....</b>	<b>50</b>
<b>5.1. Rezultati praćenja zdravstvenog stanja.....</b>	<b>50</b>
5.1.1. Klinička slika kod kokoši brojlerskih roditelja.....	50
5.1.2. Klinička slika kod fazana.....	51
<b>5.2. Rezultati patomorfološkog ispitivanja.....</b>	<b>54</b>
5.2.1. Patomorfološke promene kod brojlerskih roditelja iz inficirane grupe.....	54
5.2.1.1. Makroskopski nalaz.....	54
5.2.1.2. Mikroskopski nalaz.....	57
5.2.2. Patomorfološke promene kod brojlerskih roditelja iz kontrolne grupe.....	64
5.2.3. Patomorfološke promene kod fazana iz inficirane grupe.....	65
5.2.3.1. Makroskopski nalaz.....	65
5.2.3.2. Mikroskopski nalaz.....	69
5.2.4. Patomorfološke promene kod fazana iz kontrolne grupe.....	80
<b>5.3. Rezultati bakteriološkog ispitivanja.....</b>	<b>81</b>
<b>5.4. Rezultati serološkog ispitivanja.....</b>	<b>88</b>
<b>6. DISKUSIJA.....</b>	<b>92</b>
<b>7. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>102</b>
<b>8. SPISAK LITERATURE.....</b>	<b>104</b>

## 1. UVOD

Gajenje živine u industrijskoj proizvodnji stvorilo je uslove za nastanak bolesti infektivne i neinfektivne etiologije koje se do tada nisu javljale u malim ekstenzivnim zaptima. Uzgoj velikog broja ptica na ograničenom prostoru, naročito uz nepoštovanje tehnoloških principa i normativa i veliki proizvodni zahtevi nepovoljno su uticali na zdravstveno stanje, što je omogućilo pojedinim mikroorganizmima, za koje se ranije nije znalo, da ispolje patogeno delovanje.

Respiratorne bolesti su veoma česte u intenzivnoj živinarskoj proizvodnji zbog bliskog kontakta ptica koji pogoduje aerogenom širenju infekcije. U etiologiji respiratornih bolesti učestvuju mikroorganizmi (virusi, bakterije, gljivice) i faktori sredine. S obzirom da su klinički manifestne respiratorne infekcije uglavnom multikauzalne etiologije, veoma je bitno poznavati ulogu pojedinih infektivnih agenasa u etiopatogenezi. Uloga nekih relativno skoro otkrivenih agenasa u kompleksu respiratornih bolesti, kao što je *Ornithobacterium rhinotracheale*, još uvek se istražuje.

*Ornithobacterium rhinotracheale* poznat je od 1991. godine kada je u južnoj Africi, Jan du Preez otkrio novo oboljenje brojlera koje se manifestovalo blagim respiratornim simptomima. Bakteriološkim ispitivanjem organa obolelih brojlera otkrivena je gram-negativna, pleomorfna, štapičasta bakterija, sporog rasta, koja se nije mogla identifikovati kao neka od poznatih bakterijskih vrsta. Današnji naziv *Ornithobacterium rhinotracheale* prihvaćen je 1994. godine, kada je izvršena i klasifikacija uzročnika. Od tada je prisustvo ovog agensa otkriveno kod brojnih domaćih i divljih vrsta ptica širom sveta. Prema podacima iz literature infekcija *O. rhinotracheale* dovodi do značajnih ekonomskih gubitaka u živinarskoj proizvodnji koji su posledica povećanog mortaliteta, suprimiranog rasta, smanjene proizvodnje jaja i odbacivanja trupova na klanici. Ovaj uzročnik respiratornih bolesti ptica je jedina vrsta iz roda *Ornithobacterium* koji pripada familiji *Flavobacteriaceae*. Može da prouzrokuje akutno, kontagiozno oboljenje kod ćurića i pilića koje se prenosi direktnim i indirektnim kontaktom, a postoje indicije da je moguća i vertikalna transmisija.

Inicijalni simptomi infekcije su nazalni iscedak, kijanje, kašalj i sinuzitis na koje se ponekad nadovezuje težak respiratorni distres, prostracija i uginuće. Simptomi su

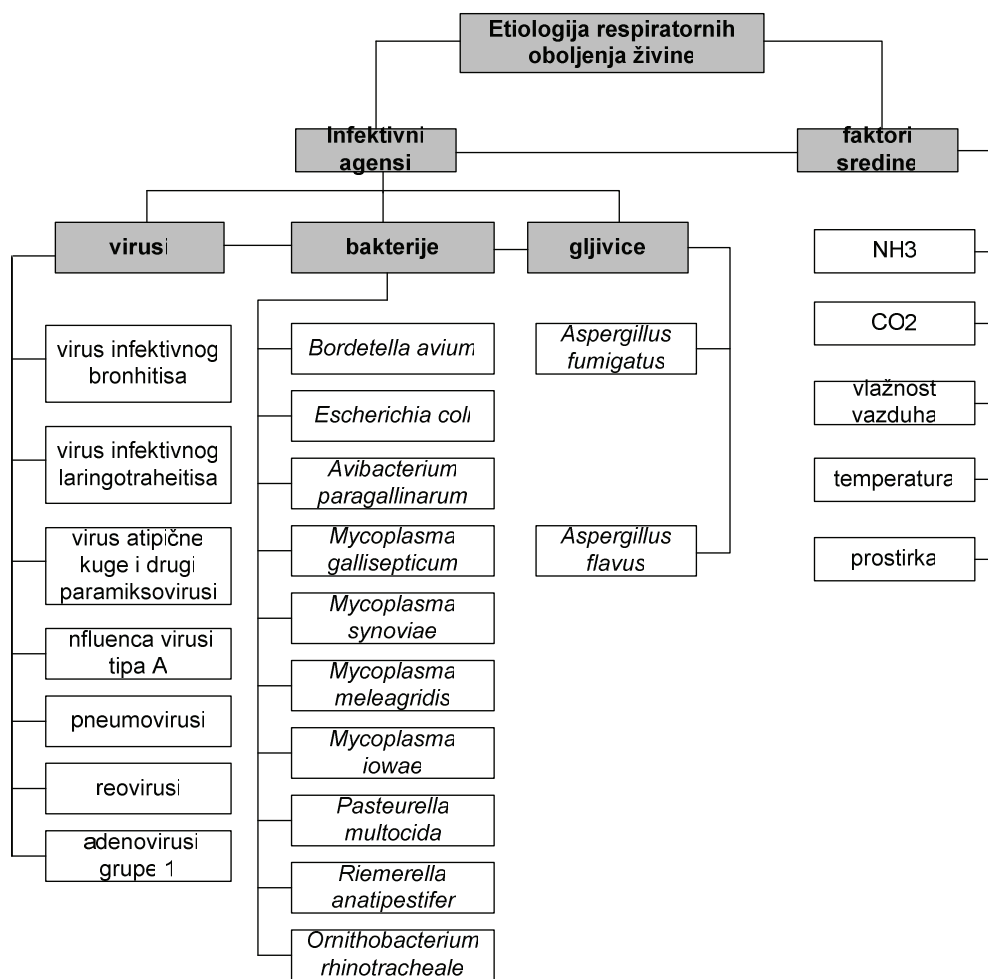
praćeni i smanjenim konzumiranjem hrane i vode. Od patoanatomskih promena javljaju se traheitis, aerosakulitis, edem pluća i pneumonija fibrinoznog do fibrinozno-gnojnog karaktera. Za izolaciju bakterija koristi se agar sa 10% ovčije krvi uz inkubaciju pod mikroaerofilnim uslovima tokom 48 h. Pretpostavlja se da su ovako složeni zahtevi za izolaciju jedan od razloga zbog kojih se *O. rhinotracheale* retko otkriva u rutinskoj dijagnostici. U terapiji oboljenja najbolje rezultate su dali: ampicilin, amoksicilin i tetraciklini. Postoje komercijalne vakcine, ali se vakcinacija retko primenjuje.

Poznato je da je uzročnik široko rasprostranjen kod živine u intenzivnoj živinarskoj proizvodnji. Objavljeno je više naučnih radova o manifestacijama infekcije kod brojlera i ćuraka, a mišljenja naučnika o patogenosti uzročnika za ove dve vrste ptica su podeljena. U literaturi ima veoma malo podataka o kliničkoj slici kod brojlerskih roditelja, dok podaci o patomorfološkim promenama ne postoje. Prema navodima iz literature *O. rhinotracheale* je izolovan iz više različitih vrsta divljih ptica, ali nema podataka o ornitobakteriozi fazana. Ovo su bili glavni razlozi koji su nas opredelili da u eksperimentalnim uslovima istražimo uticaj uzročnika na pojavu patomorfoloških promena i zdravstveno stanje dve srodne vrste ptica iz supfamilije *Phasianinae*. Ispitivanja su sprovedena na kokošima brojlerskih roditelja (*Gallus domesticus*) i fazanima (*Phasianus colchicus*) kako bi se između ostalog utvrdilo, da li se patogeno dejstvo uzročnika više ispoljava kod domaće visokoselekcionisane kokoši u odnosu na srodnu divlju vrstu.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Respiratorne bolesti ptica

U zdravstvenoj problematici intenzivne živinarske proizvodnje značajno mesto zauzimaju respiratorne bolesti koje mogu da prouzrokuju velike direktne i indirektne gubitke. Njihovom širenju pogoduje blizak kontakt ptica u velikim aglomeratima, na ograničenom prostoru, što omogućava lako aerogeno prenošenje infektivnih agenasa. U etiologiji respiratornih bolesti učestvuju mikroorganizmi: virusi, bakterije, gljivice i faktori sredine. Respiratorne infekcije mogu da izazovu: virus infektivnog bronhitisa, virus infektivnog laringotraheitisa, virus atipične kuge živine i drugi paramiksovirusi, influenza virusi tipa A, pneumovirusi, reovirusi, adenovirusi grupe 1, *Bordetella avium*, *Escherichia coli*, *Avibacterium paragallinarum*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasma meleagridis*, *Mycoplasma iowae*, *Pasteurella multocida*, *Riemerella anatipestifer*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*. Od faktora sredine značajni su koncentracija štetnih gasova, amonijaka i ugljendioksida, vlažnost vazduha, temperatura u objektu, kvalitet i stanje prostirke. Samo neki od navedenih uzročnika poput virusa atipične kuge i infektivnog bronhitisa su primarni patogeni. U većini slučajeva respiratorne bolesti su prouzrokovane većim brojem infektivnih agenasa ili kombinovanim uticajem infektivnih agenasa i nepovoljnih uslova sredine (van Empel, 1998a; Chin i saradnici, 2003).



**Shema 1. Etiologija respiratornih oboljenja živine**  
(prema podacima van Empel, 1998a; Chin i saradnici, 2003)

## 2.2. Istorijat

Jan du Preez je 1991. godine, otkrio novo oboljenje kod brojlera u južnoj Africi. Bolest se manifestovala blagim respiratornim simptomima koji su počinjali kijanjem u uzrastu od 28 dana i trajali su do kraja tovnog perioda. Mortalitet je bio povećan (preko 3%), a proizvodni rezultati, konverzija hrane i dnevni prirast, slabiji. Patoanatomski nalaz karakterisao se pojavom pneumonije i penušavog beličastog eksudata u vazдушnim kesama koji je opisan kao eksudat sličan jogurtu. Bakteriološkim ispitivanjem otkrivena je gram-negativna, pleomorfna, štapićasta bakterija, sporog rasta koja se nije mogla identifikovati kao neka od poznatih bakterijskih vrsta (van Beek i saradnici, 1994).

Ubrzo se ispostavilo da su bakterije slične pastereli koje su izolovane 1987. godine iz pataka koje su ispoljavale respiratorne simptome, u Mađarskoj, identične ovim izolatima iz južne Afrike. Bakterije opisane kao slične riemereli izolovane iz

ćuraka sa respiratornim simptomima u Nemačkoj 1991. i 1992. godine, takođe su imale iste morfološke i biohemijske osobine kao izolati iz južne Afrike (Hafez i saradnici, 1993).

Međutim, u retrospektivnim istraživanjima došlo se do saznanja da je ornitobakterijum izolovan još 1981. godine u severnoj Nemačkoj iz ćuraka starih pet nedelja koje su ispoljavale respiratorne znake u vidu nazalnog iscetka, facijalnog edema i fibrinozno-gnojnog aerosakulitisa, a 1983. godine izolovan je iz traheje mladih vrana. Uzročnik je izolovan 1986. godine u Izraelu iz ćuraka različite starosti sa nalazom aerosakulitisa i eksudativne pneumonije (Bock i saradnici, 1995, 1997). U periodu između 1986. i 1988. godine izolovan je iz jata roditeljskih ćuraka u Engleskoj u kojima su se manifestovali znaci depresije, smanjene nosivosti, kašlja, niskog mortaliteta, fibrinozno-gnojnog aerosakulitisa i pneumonije. Tada su izolovane bakterije opisane kao bakterije slične pastereli (*Pasteurella-like bacterium*) (Chin i saradnici, 2003). Izolacija ovih bakterija u Kaliforniji datira od 1986. godine, a Charlton je u periodu između 1990. i 1991. godine opisao 14 izolata poreklom od pilića i ćurića (Charlton i saradnici, 1993).

Na nekoliko farmi ćuraka u Holandiji i Nemačkoj, 1992. i 1993. godine, javili su se respiratorni poremećaji sa kliničkim znacima suzenja, kijanja, nazalnog eksudata i otoka infraorbitalnih sinusa, praćeni usporenim rastom. Na nekim od tih farmi mortalitet je konstantno rastao uprkos primeni medikamenata. Kod brojlera u ovom periodu, javljali su se blagi do srednji respiratorni problemi i akutna uginuća. U Holandiji je ova infekcija zapažena kod pilića i ćuraka u prvim nedeljama života i ličila je na pasterelozu. Klinički znaci su se pojavili kod ćuraka u starosti od 2-8 nedelja, a kod brojlera u starosti od 2-5 nedelja (van Beek i saradnici, 1994). Gram negativne štapićaste bakterije poput onih izolovanih u južnoj Africi, Nemačkoj i Mađarskoj izolovane su iz tkiva uginulih ptica i u ovim slučajevima. U Nemačkoj se u tom periodu infekcija *O. rhinotracheale* javljala kod ćuraka starijih od 14 nedelja (Hafez i saradnici, 1993).

Provobitno je novootkrivena bakterija nazivana pleomorfni gram-negativni štapić (*pleomorphic gram-negative rod*- PGNR) (Charlton i saradnici, 1993), pastereli slična (Hafez i saradnici, 1993) ili kingeli slična bakterija (van Beek i saradnici, 1994). Kasnije je Bisgaard ustanovio da bi ona mogla biti klasifikovana u okviru grupe bakterija koje se označavaju kao TAXON 28 (van Empel i Hafez, 1999). Godine 1994. predloženo je ime *Ornithobacterium* za ovaj novi rod u okviru rRNK superfamilije V, a za vrstu naziv *rhinotracheale* (Vandamme i saradnici, 1994).

Postoji mišljenje da su infekcije izazvane ornitobakterijumom kod živine pre 1993. godine pogrešno pripisivane virusima ili bakterijama kao što su: *Pasteurella*, *Riemerella*, *Flavobacterium/Cytophaga* spp. ili NADH nezavisna vrsta *Haemophilus paragallinarum* (Mouahid i saradnici, 1992; Hafez i saradnici, 1993; Bragg i saradnici, 1997). Kada je promenjen rutinski način izolacije bakterija, uzročnika respiratornih oboljenja živine, što se odnosi na produženje inkubacionog perioda u sredini sa 5-10% CO<sub>2</sub>, *O. rhinotracheale* je izolovan u slučajevima aerosakulitisa i pneumonije kod ćuraka i brojlera širom sveta (van Beek i saradnici, 1994; Ryll i saradnici, 1996; Travers i saradnici, 1996; Odor i saradnici, 1997; Roepke i saradnici, 1998).

*Ornithobacterium rhinotracheale* je izolovan iz mnogih vrsta ptica: kokoši, pataka, gusaka, ćuraka, fazana, golubova, galebova, jarebica, prepelica, nojeva, biserki i vrana (Charlton i saradnici, 1993; Vandamme i saradnici, 1994; Devriese i saradnici, 1995; van Empel i saradnici, 1997). Široka rasprostranjenost infekcije kod ptica dokazana je i serološki u mnogim zemljama (Hafez i Sting, 1996; Ryll i saradnici, 1997; van Empel i Hafez, 1999; Canal i saradnici, 2003; Chansiripornchai i saradnici, 2007).

Istraživanjem kolekcija izolovanih kultura mikroorganizama u Nemačkoj otkriveno je da je *O. rhinotracheale* prvi put izolovan iz respiratornog trakta ćuraka 1981. godine (Vandamme i saradnici, 1994). U literaturi nema podataka da je pre toga uzročnik bio izolovan bilo gde u svetu (Hinz i Hafez, 1997). Na osnovu genetskih ispitivanja naučnici smatraju da su ove bakterije relativno skoro prešle sa divljih na domaće vrste ptica (Amons i saradnici, 1997).

Terapija bolesti uobičajenim oralnim antibioticima nije davala zadovoljavajuće rezultate. Naročito u slučajevima klinički izražene pneumonije, primena enrofloksacina ili trimetoprim-sulfametoksazola nije bila efikasna. I pored terapije, gubici su iznosili čak i do 25% u par nedelja. Izolovani sojevi iz ovakvih slučajeva u Holandiji bili su većinom rezistentni na flumekvin, a samo neznatno osetljivi na enrofloksacin i trimetoprim u kombinaciji sa sulfonamidom. Tetraciklin, ampicilin i amoksisicilin pokazali su se kao veoma efikasni (Hafez i saradnici, 1993; van Beek i saradnici, 1994; van Empel, 1998a).

## 2.3. Etiologija

### 2.3.1. Klasifikacija

*Ornithobacterium rhinotracheale* je jedina vrsta iz roda *Ornithobacterium* koji pripada familiji *Flavobacteriaceae* i rRNK superfamiliji V. Rod *Ornithobacterium* je u bliskom taksonomskom srodstvu sa rodovima: *Riemerella*, *Flavobacterium*, *Weeksella* i *Capnocytophaga* (Vandamme i saradnici, 1994).

Vrsta: *Ornithobacterium rhinotracheale*

Rod: *Ornithobacterium*

Familija: *Flavobacteriaceae*

Red: *Flavobacteriales*

Klasa: *Flavobacteria*

Tip: *Bacteroidetes* (Euzéby, 1997).

### 2.3.2. Morfološke osobine

*Ornithobacterium rhinotracheale* je gram-negativna, nepokretna, pleomorfna, štapićasta bakterija. Ne stvara spore ni kapsulu. Sadržaj G+C parova kod ovog uzročnika iznosi između 37 i 39 mol%. Bakterijske ćelije su šljivolikog oblika debljine 0,2 do 0,9 µm, a dužina varira od 0,6 do 5 µm. Nije utvrđeno da poseduju posebne strukture kao što su pili, fimbrije, plazmidi niti specifičnu toksičnu aktivnost (Vandamme i saradnici, 1994; Leroy-Sétrin, 1998).

### 2.3.3. Kulturelne osobine

*Ornithobacterium rhinotracheale* se ubraja u mezofilne (raste na temperaturi od 30 do 42° C), hemoorganotrofne mikroorganizme. Raste u aerobnoj, anaerobnoj, mikroaerofilnoj i atmosferi obogaćenoj ugljendioksidom (Euzéby, 1997).

Optimalan rast se postiže inkubiranjem na krvnom agaru sa 5% ovčije krvi, tokom 48 h u mikroaerofilnoj sredini (5 do 10% CO<sub>2</sub>) na temperaturi od 37° C. Pod ovim uslovima kolonije *O. rhinotracheale* izrastu u vidu tačkica nakon inkubacije u trajanju od 24 h. Posle 48 h razvijaju se male, cirkularne, konveksne, sive do sivo-bele kolonije, sa kontinuiranim ivicama, ponekad sa crvenim odsjajem. Oko njih se ne stvara zona hemolize (Chin i saradnici, 2003).



Iako je *O. rhinotracheale* prvobitno okarakterisan kao beta nehemolitičan, istraživanja sprovedena na severnoameričkim izolatima su pokazala, da pod određenim uslovima, mogu da daju hemolizu na krvnom agaru. Hemoliza se javlja kada se nakon inicijalne inkubacije u mikroaerofilnoj sredini sa 7,5% CO<sub>2</sub>, u trajanju od 48 h, hranljive podloge inkubiraju dodatnih 48 h u aerobnoj sredini, na sobnoj temperaturi. Ispitivanjem osobina 23 izolata pod navedenim uslovima, utvrđeno je da na agaru sa ovčijom krvi mogu da daju zonu  $\alpha$ -hemolize,  $\beta$ -hemolize ili ne daju hemolizu (Tabatabai i saradnici, 2010).

Kolonije *O. rhinotracheale* karakteriše intenzivan miris koji podseća na buternu kiselinu. U primarnoj izolaciji većina kolonija pokazuje varijacije u širini od 1 do 3 mm posle inkubacije u trajanju od 48 h. U supkulturi je veličina kolonija uniformnija. Ne raste na „MacConkey“ agaru, „Endo“ agaru, „Simon’s“ citratnom agaru. Rast na tečnim podlogama zavisi od soja, a podesni su „Brain-heart infusion broth“, „Pasteurella broth“, „Todd Hewitt broth“ (Chin i saradnici, 2003).

Kada raste u tečnom medijumu *O. rhinotracheale* je pleomorfniiji nego na čvrstim podlogama poput agara. Često formira nestabilne lance koji mogu da sadrže od nekoliko do više hiljada bakterijskih ćelija i koji se lako raspadaju. Dobra selektivna podloga još uvek nije dostupna ali se rast drugih bakterija može suprimirati dodavanjem gentamicina i polimiksina (oba po 5 µg/ml) krvnom agaru sa 5% ovčije krvi. Pošto je oko 90% sojeva *O. rhinotracheale* osetljivo na oba antibiotika, istovremeno treba zasejati i krvni agar sa 5% ovčije krvi bez antibiotika (van Empel, 1997; Hafez, 2002).

#### **2.3.4. Biohemijske osobine**

U mikrobiološkoj dijagnostici rezultati konvencionalnih biohemijskih testova mogu da budu nekonzistentni (Chin i saradnici, 2003). U tabeli 1. navedene su neke od biohemijskih osobina uzročnika od značaja za dijagnostiku.

**Tabela 1. Enzimi koje luči *O. rhinotracheale***

TEST	REZULTAT
Alkalna fosfataza	+
Esteraza-lipaza	+
Leucin aminopeptidaza	+
Valin aminopeptidaza	+
Cistin aminopeptidaza	+
Kisela fosfataza	+
Fosfohidrolaza	+
$\alpha$ -Galaktozidaza	+
$\beta$ -Galaktozidaza	+
$\alpha$ -Glukozidaza	+
N-acetil- $\beta$ -glukozamidaza	+
Tripsin	+
$\alpha$ -Himotripsin	+
Lipaza	-
$\beta$ -Glukuronidaza	-
$\beta$ -Glukozidaza	-
$\alpha$ -Manozidaza	-
$\alpha$ -Fukozidaza	-

(Chin i saradnici, 2003)

Ispitivanjem 56 sojeva različitog porekla koji su pripadali različitim serotipovima utvrđeno je da kada se ispitivanja izvode pod optimalnim uslovima, *O. rhinotracheale* proizvodi oksidazu, beta-galaktozidazu, arginin dehidrolazu, alkalnu fosfatazu, esterazu-lipazu, leucin arilamidazu, cistin arilamidazu, kiselu fosfatazu, fosfohidrolazu, alfa-glukozidazu, N-acetil- $\beta$ -glukozamidazu, stvara kiselinu bez gasa iz glukoze, fruktoze, laktoze i galaktoze. Ne proizvodi katalazu, lizin dekarboksilazu, ornitin dekarboksilazu, želatinazu, esterazu (C4), lipazu (C14), himotripsin, beta-glukuronidazu, alfa-manozidazu, alfa-fukozidazu, ne razlaže trostruki šećer sa gvožđem, ne redukuje nitrata do nitrita, ne stvara kiselinu iz maltoze, saharoze, fruktoze i riboze (van Empel i Hafez, 1999).

### 2.3.5. Osetljivost na hemijske agense

Sojevi *O. rhinotracheale* potpuno se inaktiviraju 0,5% rastvorom mravlje kiseline i oksal-sirćetne kiseline i 0,5% rastvorom aldehidnog jedinjenja (20% glutaraldehid) nakon izlaganja u trajanju od 15 minuta (Hafez i Schulze, 1998).

### 2.3.6. Serotipovi i sojevi

Primenom seroloških metoda dokazano je postojanje 18 serotipova koji se označavaju latiničnim slovima od A do R. Visok procenat (94%) izolata poreklom od pilića i 57% izolata poreklom od ćurića pripada serotipu A. Postoji korelacija između geografskog porekla bakterija i pripadnosti određenom serotipu. Serotip C izoluje se samo iz pilića i ćurića iz južne Afrike i SAD-a. Nema dokaza za postojanje specifičnosti određenog serotipa prema domaćinu (van Empel i saradnici, 1997; Hafez, 1998b; van Empel, 1998b). Serotipovi A i C poreklom od pilića i serotipovi B, D i E poreklom od ćuraka ispoljavaju približnu virulentnost i za piliće i za ćurke. Objašnjenje za različitu distribuciju serotipova kod ovih vrsta moglo bi se tražiti u različitoj industrijskoj praksi u njihovom uzgoju (van den Bosch, 2001).

Amonsin i saradnici (1997) su primenom PCR metode (*polimerase chain reaction* - lančana reakcija polimeraze) ustanovili da većina od 55 ispitanih izolata poreklom od domestifikovanih ptica širom sveta ima ograničenu heterogenost i da pripada maloj grupi blisko udruženih klonova. Zbog toga pretpostavljaju da su ove bakterije u skorije vreme prešle sa divljih na domaće vrste ptica.

### 2.4. Domaćini

*Ornithobacterium rhinotracheale* je izolovan širom sveta iz brojnih vrsta ptica: kokošaka, ćuraka, pataka, gusaka, golubova, galebova, nojeva, fazana, biserki, jarebica, prepelica (Charlton i saradnici, 1993; Vandamme i saradnici, 1994; van Empel i Hafez, 1999).

### 2.5. Putevi prenošenja

Infekcija *O. rhinotracheale* se prenosi horizontalno, direktnim i indirektnim putem; živina se najčešće inficira aerogeno ili peroralno preko vode za piće. Objavljena su istraživanja koja idu u prilog postojanju i vertikalne transmisije (van Empel, 1998a).

Na jednom primeru eksperimentalne infekcije roditeljskih ćuraka starih 55 nedelja potvrđeno je da *O. rhinotracheale* može da preživi u jajniku i jajovodu ne dovodeći do pojave kliničkih simptoma (Back i saradnici, 1997, 1998b; Nagaraja i saradnici, 1998).

U drugom eksperimentu korišćeni su brojlerski pilići i ćurići izleženi iz seropozitivnih roditeljskih jata. Ove ptice su bile u potpunoj izolaciji za vreme istraživanja, dobijale su sterilnu hranu i vodu. Nakon inficiranja virusom atipične kuge peradi (*Newcastle disease virus* - NDV) i virusom rinotraheitisa ćuraka (*turkey rhinotracheitis virus* - TRTV) aerosolom, *O. rhinotracheale* je izolovan iz vazdušnih kes.

Ovo potvrđuje da se *O. rhinotracheale* prenosi jajima i to ili transovarijalno ili kontaminacijom prilikom prolaska jajeta kroz kloaku - pseudovertikalni put prenošenja. *Ornithobacterium rhinotracheale* je izolovan iz ljuski jaja i žumancetne kese jednodnevnih ptica (u manje od 1% slučajeva) (van Empel, 1997). Rezultati ovih istraživanja ukazuju da je vertikalna transmisija moguća, a njome bi se moglo objasniti brzo širenje *O. rhinotracheale* u komercijalnoj živinarskoj proizvodnji u poslednjih 15 godina (Tanyi, 1995).

## 2.6. Patogeneza

Živina u intenzivnom uzgoju može da se inficira u svim uzrastima, mada je patogenost uzročnika za ćurke izraženija kod starijih jedinki. Zapaženi su brojni slučajevi udruženih infekcija prouzrokovanih *O. rhinotracheale* i drugim mikroorganizmima, uzročnicima respiratornih oboljenja živine: *Escherichia coli*, *Bordetella avium*, NDV, virus infektivnog bronhitisa (*Infectious bronchitis virus* - IBV), TRTV, *Mycoplasma synoviae* (De Rosa i saradnici, 1997; Odor i saradnici, 1997; Salem i saradnici, 1997; Erbeck i McMurray, 1998; Charlton, 1999; Sakai i saradnici, 2000; Zorman-Rojs i saradnici, 2000).

U pogledu patogenosti uzročnika u literaturi se ističu dva gledišta. Jedna grupa istraživača smatra da *O. rhinotracheale* uzrokuje minimalne patološke promene kod pilića i ćurića i da se intenzitet ispoljavanja patoloških promena pojačava drugim mikroorganizmima (virusima i bakterijama) uzročnicima respiratornih bolesti (van Empel i saradnici, 1996; Back i saradnici, 1997; Droual i Chin, 1997; Franz i saradnici, 1997; van Empel i saradnici, 1999). Nasuprot ovakvom mišljenju, Ryll i saradnici (1996), Travers i saradnici (1996), Sprenger i saradnici (1998) i van Veen i saradnici (2000b) objavljuju radove u kojima se iznosi da se eksperimentalnim inficiranjem samo ornitobakterijumom, bez drugih mikroorganizama mogu izazvati patološke promene slične onima kod prirodne infekcije, što ide u prilog stavu da je uzročnik primarni patogen.

U eksperimentu koji je izveo Paul van Empel sa grupom istraživača 1999. godine, pokazano je da *O. rhinotracheale* uzrokuje zapaljenje pluća i vazdušnih kesa, pošto su u prvoj nedelji nakon eksperimentalnog inficiranja aerosolom SPF (*specific pathogen free* - slobodni od specifičnih patogenih uzročnika) leghorn pilića (prethodno inficiranih NDV-om), izolovane samo čiste kulture ovih bakterija koje su otkrivene i imunohistohemijski u tkivima. U eksperimentu su bile 4 grupe od po 30 pilića. Prva grupa inficirana je NDV-om 21. dana, a ornitobakterijumom 26. dana. Druga grupa inficirana je samo ornitobakterijumom 26. dana.

U prvoj grupi, dva dana nakon inficiranja ornitobakterijumom, epitel vazdušnih kesa infiltruju makrofagi i polimorfonukleari. Vazdušne kese postaju edematozne i dolazi do formiranja granuloma. *O. rhinotracheale* je imunohistohemijski detektovan u svim delovima vazdušnih kesa, ali je najviše vezan za makrofage. Aerosakulitis je bio najizraženiji 5-9 dana od inficiranja, nakon čega je usledio oporavak. Na delovima BALT-a u plućima javile su se promene posle 4 ili 5 dana od inficiranja ornitobakterijumom, čiji su antigeni imunohistohemijski otkriveni u tim lezijama. Ni u jednom drugom organu nisu nađeni antigeni *O. rhinotracheale*.

U drugoj grupi pilića zapažena je minimalna infiltracija vazdušnih kesa polimorfonuklearima, jedan dan nakon inficiranja. Imunohistohemijski je detektovan *O. rhinotracheale* pričvršćen za cilije epitela vazdušnih kesa samo prvog dana posle inficiranja, a kasnije se više nije mogao detektovati u tkivu (van Empel i saradnici, 1999).

Ovaj eksperiment u značajnoj meri rasvetljava patogenezu infekcije *O. rhinotracheale*. Veoma je važan podatak da inficiranje pilića ornitobakterijumom, aerosolom, bez prethodne virusne infekcije ne dovodi do značajnih promena na respiratornom traktu. Kod ovih pilića zapažene su samo neznatne promene na vazdušnim kesama koje su ubrzo iščezle, a nastale su kao posledica pričvršćivanja bakterija za respiratorni epitel. *Ornithobacterium rhinotracheale* se posle 2 dana nije mogao detektovati u tkivu ni bakteriološki ni imunohistohemijski. Rezultati opisanog eksperimenta idu u prilog stavu da *O. rhinotracheale* nije u stanju da samostalno izazove patološke promene i da se promene ispoljavaju u prisustvu drugih mikroorganizama uzročnika respiratornih oboljenja, u ovom slučaju NDV-a.

Iako opisani eksperiment u značajnoj meri doprinosi razumevanju infekcije *O. rhinotracheale*, treba uzeti u obzir i podatke do kojih su došli drugi istraživači, a koji idu u prilog stavu da je uzročnik primarni patogen. Ovi podaci izneti su u poglavlju „Eksperimentalna infekcija“.

U cilju utvrđivanja faktora koji doprinose patogenezi infekcije *O. rhinotracheale*, istraživana je interakcija *O. rhinotracheale* i epitelnih ćelija. Eksperimentalnim inficiranjem u uslovima *in vitro*, pokazano je da se *O. rhinotracheale* veoma efikasno atherira za različite vrste ćelija iz kultura epitelnih ćelija, sa nivoom do 80 atherirajućih bakterija po ćeliji, 3 časa nakon inficiranja. Poređenjem različitih *O. rhinotracheale* izolata utvrđeno je da svi testirani sojevi imaju atherentno svojstvo, ali različitog intenziteta. Analizom spoljašnje membrane atherentnih sojeva metodom elektroforeze „SDS-PAGE“ utvrđeno je da postoje razlike među sojevima u elektroforetskoj pokretljivosti proteinskog i lipopolisaharidnog dela. Analizom infekcije u prisustvu prečišćenog lipopolisaharida (LPS), dobijenog od *O. rhinotracheale*, došlo se do saznanja da postoji LPS-dozno zavisna inhibicija athezije ove bakterije. Ustanovljeno je da je ovaj efekat specifičan za soj pošto inhibiciju ne prouzrokuje lipopolisaharid iz svih sojeva. Ovaj podatak pokazuje da je athezija *O. rhinotracheale* za epitelne ćelije omogućena posredstvom jedinstvenog soj specifičnog i LPS osetljivog mehanizma.

Kako bi se bolje razumela interakcija *O. rhinotracheale* i makrofaga, inficirani su HD-11 pileći makrofagi *O. rhinotracheale* sojem 30. Mikroskopski je utvrđena pojava dozno zavisne neopsonizujuće atherencije i unošenja *O. rhinotracheale* u makrofage. Merenjem proizvodnje azotnog oksida (NO) kao markera inflamacije, došlo se do zaključka da *O. rhinotracheale* stimuliše njegovu proizvodnju, mada znatno slabije od enterobakterija (*E. coli* i *S. enteritidis*).

Prethodnim tretiranjem makrofaga rekombinantnim pilećim gama interferonom (rChIFN $\gamma$ ), neznatno se povećava proizvodnja azot oksida. Lipid A poreklom od polimiksina B ne inhibira proizvodnju azot oksida koju stimuliše *O. rhinotracheale*. Ovo jedinjenje efikasno blokira proizvodnju koju indukuju enterobakterije. Dodavanjem prečišćenog LPS-a poreklom od *O. rhinotracheale*, HD 11 ćelijama stimulisanim na proizvodnju azot oksida, na polimiksin B osetljiv način (prethodno tretiranim rChIFN $\gamma$ ), pokazalo se da u prečišćenoj formi LPS poreklom od *O. rhinotracheale* pokazuje proinflamatornu aktivnost. Eksperimentalnim inficiranjem makrofaga miševa, stimulisanim rMoINF $\gamma$ -om pokazano je da ni *O. rhinotracheale* ni prečišćeni LPS ne stimulišu proizvodnju azot oksida.

Na osnovu ovog eksperimenta može se zaključiti da se *O. rhinotracheale* brzo unosi u makrofage i da podstiče inflamatorni odgovor u pilećim makrofagima posredstvom stimulusa nezavisnog od LPS-a. Lipopolisaharid dobijen od *O.*

*rhinotracheale* je bioaktivan samo u prečišćenoj formi. Različit odgovor pilećih i mišijih ćelija ukazuje na specifičnost infekcije za vrstu (Chansiripornchai, 2004).

## 2.7. Inkubacioni period

Eksperimentalnim inficiranjem ćuraka u starosti od 22 nedelje, intratrahealno, prvi simptomi u vidu depresije, kašlja i smanjenog konzumiranja hrane javljaju se za 24 h. Posle 48 h od inficiranja, bolesne ćurke iskašljavaju krvavo-sluzav sadržaj, a nakon 5 dana zapažaju se znaci oporavka (Sprenger i saradnici, 1998).

Eksperimentalnim inficiranjem pilića u starosti od pet nedelja aerosolom, bakterije dospevaju u respiratorne organe posle 2 dana, a klinički znaci zapažaju se posle 4 dana (van Empel i saradnici, 1999).

## 2.8. Klinička slika

*Ornithobacterium rhinotracheale* može da prouzrokuje akutno, visoko kontagiozno oboljenje kod živine, ali izraženost kliničkih znakova, trajanje oboljenja i procenat mortaliteta kod potvrđenih infekcija veoma se razlikuju (tabela 2). Razlozi leže u uticajima brojnih faktora sredine (nepoštovanje tehnoloških principa i zoohigijenskih normativa), drugih oboljenja i sekundarnih infekcija (van Empel i Hafez, 1999).

**Tabela 2. Dužina trajanja i procenat mortaliteta potvrđenih infekcija *O. rhinotracheale***

	starost (u nedeljama)	mortalitet (%)	trajanje (u danima)
ćurke	>2	1-15	7-8
brojleri	3-4	0-10	5-8
brojlerski roditelji	24-52	1-3	>21

(van Empel i Hafez, 1999)



### 2.8.1. Klinička slika kod brojlera

Kod brojlera se oboljenje manifestuje na dva načina. Bolest se najčešće ispoljava respiratornim poremećajima kada se klinički znaci javljaju između treće i šeste nedelje života sa mortalitetom od 2 do 10%. Javlja se depresija, nazalni iscedak, kijanje, facijalni edem, smanjeno uzimanje hrane i smanjen prirast (Franz i saradnici, 1997; Odor i saradnici, 1997; van Empel i Hafez, 1999).

Ponekad se bolest manifestuje supkutanim edemima glave i iznenadnim uginućima mladih pilića (čak do 20% u nekoliko dana) kao posledica osteitisa, osteomijelitisa i encefalitisa, što može ali i ne mora da bude praćeno respiratornim simptomima (Goovaerts i saradnici, 1998).

Respiratorni virusi kao što su NDV i IBV pojačavaju ispoljavanje simptoma poremećaja respiratornih organa (Travers, 1996). Travers i saradnici (1996) opisuju tri sindroma vezana za ovu infekciju. Prvi je primarno vezan za respiratorni trakt, drugi se karakteriše slabo izraženim respiratornim znacima uz izrazit peritonitis pri patoanatomskom pregledu, a treći uz respiratorne znake odlikuju artritis i hromost. Sva tri sindroma praćena su smanjenim prirastom i povećanom konverzijom hrane.

*Ornithobacterium rhinotracheale* se češće javlja tokom zimskih meseci, verovatno kao posledica lošije ventilacije i višeg nivoa amonijaka i prašine u objektima u ovom periodu godine (Schleifer, 1997).

### 2.8.2. Klinička slika kod brojlerskih roditelja

Kod brojlerskih roditelja oboljenje zahvata ptice u periodu nošenja, uglavnom u špicu nosivosti ili neposredno pre pronošnja. Javlja se neznatno povišenje mortaliteta, smanjeno je uzimanje hrane i prisutni su blagi respiratorni simptomi. Mortalitet je varijabilan ali relativno nizak u nekomplikovanim slučajevima. Može se javiti pad nosivosti, smanjenje veličine jaja i smanjen kvalitet ljuske. Procenat oplođenih i izleženih jaja u većini slučajeva nije promenjen (Hafez, 1996).

Asadpour i saradnici (2008) sprovedli su ispitivanje prisustva *O. rhinotracheale* u 22 jata brojlerskih roditelja u Iranu. Uzročnik je izolovan iz trahealnih briseva, uzorkovanih iz pet jata različite starosti koja u vreme uzimanja uzoraka nisu ispoljavala bilo kakve simptome.



*Ornithobacterium rhinotracheale* je izolovan iz uginulih embriona kao i jednodnevnih brojlera i ćurića u inkubatorima u Egiptu, gde je postojao problem povećanog mortaliteta embriona (El-Gohary, 1998).

### **2.8.3. Klinička slika kod komercijalnih nosilja**

Kod komercijalnih nosilja bolest se može manifestovati smanjenjem nosivosti, povećanim procentom jaja deformisane ljuske i povišenim mortalitetom (Sprenger i saradnici, 2000).

### **2.8.4. Klinička slika kod ćuraka**

Kod ćuraka starijih od 8 nedelja klinički znaci su izraženiji, dok infekcija u mladim jatima (2 do 8 nedelja) obično prolazi asimptomatski (Roepke i saradnici, 1998). Bolest je češće zapažena kod ćurana u starosti oko 14 nedelja, a mortalitet je naročito visok kod jedinki starijih od 20 nedelja. Infekcija se najčešće ispoljava u zimskim mesecima (Hafez i saradnici, 1993; Schleifer, 1997).

Mortalitet se kreće između 1 i 15% u toku akutne faze bolesti (8 dana), ali su zabeleženi slučajevi sa znatno višim mortalitetom, čak i do 50% (De Rosa i saradnici, 1996; Back i saradnici, 1998a). Početni klinički znaci su: kašalj, kijanje i nazalni iscedak, koje u nekim slučajevima prate ozbiljni respiratorni poremećaji: dispnoja, prostracija, sinuzitis. Smanjeno je uzimanje hrane i vode. Bolest traje 7 do 10 dana, a klinički znaci u nekim slučajevima zapažaju se samo kratko vreme pre smrti.

### **2.8.5. Klinička slika kod roditeljskih ćuraka**

U roditeljskim jatima može se javiti pad nosivosti i povećanje broja neizležanih jaja (Schleifer, 1997; van Empel i Hafez, 1999).

U najkraćim crtama znaci infekcije mogu se prikazati i na sledeći način:

1. Relativno blagi respiratorni znaci kod mladih ptica koji počinju kijanjem, a udruženi su sa neznatnim povišenjem mortaliteta, ali značajnim indirektnim gubicima (slabiji prirast, veliki broj škartova).

2. Iznenadna uginuća mladih ptica usled promena lokalizovanih na glavi u vidu osteitisa, osteomijelitisa i encefalitisa. Ovaj oblik može se javiti sam ili udružen sa respiratornim simptomima.
3. Akutna pneumonija sa povišenim mortalitetom (čak i do 50%), kod ćuraka starijih od 12 nedelja.
4. Kod starijih ćuraka pareze i paralize, usled artritisa, osteitisa, osteomijelitisa.
5. Kod roditeljskih ćuraka, brojlerskih roditelja i komercijalnih nosilja pad nosivosti i smanjen kvalitet ljuske jaja. Ovaj vid infekcije se teško prepoznaje (van den Bosch, 2001).

## 2.9. Patoanatomske promene

Najvažnije promene manifestuju se na respiratornim organima, mada su često promenjeni i drugi organi. Na osnovu opisanih primera infekcije kod pilića, teško je odvojiti promene specifične za ovu bakteriju pošto su one u većini slučajeva posledica udruženog dejstva *O. rhinotracheale* i drugih mikroorganizama. Kod ćuraka postoje primeri eksperimentalne monoinfekcije prouzrokovane ornitobakterijumom koji pružaju mogućnost za realnije sagledavanje patogenosti uzročnika i patoloških promena koje on može da izazove.

Kod brojlerskih pilića inficiranih ornitobakterijumom mogu da se jave: sinuzitis, traheitis, aerosakulitis, hepatomegalija, splenomegalija, perikarditis i pneumonija. Najupečatljivije promene vezane su za respiratorni sistem, a najčešće se sreću: aerosakulitis, pleuritis i pneumonija (El-Gohary i saradnici, 1998).

Van den Bosch (2001) navodi da se kod inficiranih brojlera u vazдушnim kesama javlja penušav, beo eksudat, sličan jogurtu, često udružen sa unilateralnom pneumonijom. Ove promene obično iščezavaju nakon nedelju dana, a mogu da budu maskirane napredovanjem drugih infekcija i kao takve neprepoznatljive u daljem periodu.

U literaturi se opisuje više slučajeva udruženih infekcija u kojima uz *O. rhinotracheale* učestvuju NDV ili IBV (van Empel i saradnici, 1996; Odor i saradnici, 1997). Odor i saradnici (1997) opisuju udružene infekcije izazvane ornitobakterijumom i IBV-om kod brojlera na poluostrvu Delmarva u Americi. Patoanatomski nalaz karakterisao se profuznim žutim ili belim, tečnim, penušavim sadržajem sa kazeoznim „ostrvcima“ u vazдушnim kesama. Neki autori ovakav eksudat opisuju kao eksudat sličan jogurtu - „yoghurt-like“ (van Empel i saradnici, 1996; Sakai i saradnici, 2000).

Nalaz je karakterisalo i prisustvo pleuralnog eksudata ili fibrinoznog pleuritisa, fibrinozne pneumonije, češće unilateralne i formiranje priraslica za zid grudnog koša. Kod nekih pilića bila su zahvaćena cela pluća, a kod drugih samo deo (Odor i saradnici, 1997).

Van Empel i saradnici (1996) opisuju patoanatomske promene kod brojlera nastale kao posledica eksperimentalne infekcije prouzrokovane ornitobakterijumom i NDV-om. Utvrđen je aerosakulitis koji se manifestovao penušavim eksudatom i nakupljanjem fibrina i pneumonija (u većini slučajeva unilateralna), sa jasnom granicom između zahvaćenog i zdravog dela plućnog tkiva.

U ovakvim slučajevima teško je razgraničiti koje su promene posledica bakterijske, a koje virusne infekcije, pa se može govoriti o udruženom ili sinergističkom delovanju navedenih mikroorganizama u izazivanju patoanatomskih promena (Travers, 1996; Odor i saradnici, 1997).

U nekim slučajevima infekcija izazvana *O. rhinotracheale* kod brojlera se manifestovala supkutanim edemima glave uz prisustvo osteitisa, osteomijelitisa i encefalitisa (Goovaerts i saradnici, 1998; Goovaerts i saradnici, 1999).

Opisane su i degenerativne promene na srčanoj muskulaturi (Hafez i saradnici, 1993).

Patološke promene prouzrokovane ovom bakterijom kod brojlerskih pilića mogle su da budu razlog visokog procenta odbacivanja trupova na klanicama koji je u nekim slučajevima iznosio preko 50% (van Veen i saradnici, 2000a).

*Ornithobacterium rhinotracheale* kod ćuraka može da izazove sinuzitis, traheitis, aerosakulitis, hepatomegaliju, splenomegaliju, perikarditis i pneumoniju (Hafez i saradnici, 1993; De Rosa i saradnici, 1996; Back i saradnici, 1998b; Roepke i saradnici, 1998; Joubert i saradnici, 1999; Zorman-Rojs i saradnici, 2000).

U jednom slučaju oboljenja roditeljskih ćuraka u Americi obdukovano je 16 ćuraka starosti 27-42 nedelje kompanije A i 14 ćuraka starosti 31-32 nedelje kompanije B. Sluznica sinusa bila je hiperemična kod većine obdukovanih ćuraka. Zidovi vazdušnih kesica bili su jako zadebljali zbog prisustva fibrinoznog eksudata, a kod nekoliko ćuraka vazdušne kese je ispunjavao kazeozni eksudat. Kod većine ćuraka jetra je bila uvećana, hiperemična sa bledim područjima po rubovima. Kod pojedinih leševa slezina i bubrezi su bili hiperemični. Kod nekoliko leševa uočen je perikarditis koji se karakterisao prisustvom petehija na epikardu i zamućenog eksudata u osrčju. Kod 26 ćuraka utvrđene su promene na plućima u vidu unilateralne ili bilateralne konsolidacije. Pluća su bila uvećana, čvrsta, hiperemična i sa fibrinoznim eksudatom na pleuri. Manje

učestao nalaz bio je fibrinozni eksudat u peritonealnoj šupljini i zglobovima (kod nekoloko leševa) i prisustvo askarida u crevima (De Rosa i saradnici, 1996).

Najkonzistentnije patoanatomske promene kod inficiranih ćuraka i kokoši brojerskih roditelja u Sloveniji činili su: aerosakulitis, unilateralna ili bilateralna pneumonija, i akumulacija fibrina na plućima i pleuri (Zorman-Rojs, 2000).

Obdukcijom leševa uginulih i eutanaziranih ćuraka nakon eksperimentalnog inficiranja ornitobakterijumom intratrahealno, utvrđen je konjunktivitis (u medijalnom očnom uglu nalazio se beličast eksudat). Vazdušne kese bile su zadebljelih zidova i ispunjene belim do žutim kazeoznim sadržajem. Perikardijum je često bio hiperemičan, zadebljao, zamućen, neproziran i ispunjen kazeoznim, žuto-belim eksudatom. Promene na plućima manifestovale su se u vidu hiperemije i pneumonije fibrinoznog do fibrinožno-gnojnog karaktera. Eksperimentalnim inficiranjem ćuraka aerosolom prouzrokovan je aerosakulitis koji se manifestovao prisustvom penušave mutne tečnosti u vazдушnim kesama i edem pluća (Sprenger i saradnici, 1998). Ovaj eksperiment je detaljnije opisan u poglavlju „Eksperimentalna infekcija“.

## **2.10. Histopatološke promene**

Histopatološke promene najčešće se otkrivaju u plućima, pleuri i vazдушnim kesama. U slučajevima infekcije u farmским uslovima, u plućima se javlja hiperemija i nakupljanje fibrina pomešanog sa makrofagima i heterofilima, koji se mogu videti slobodni u lumenu parabronhija i vazдушnih kapilara. Intersticijum je difuzno infiltrovan makrofagima i u manjem broju heterofilima. Uočavaju se i fokalne koagulacione nekroze, čiji je centar smešten u lumenu parabronhija odakle se šire na okolni parenhim. Nekrotična ognjišta ispunjena su gustim nakupinama nekrotizovanog heterofilnog infiltrata ili eksudata u kojima mogu biti rasute i male grupe bakterija. Mnogi kapilarni krvni sudovi su prošireni i ispunjeni fibrinskim trombima. Pleura i vazdušne kese mogu da budu znatno zadebljale, edematozne ili sa intersticijalnim fibrinskim depozitima. Difuzno su infiltrovane heterofilima i prožete malim ognjištima nekrotizovanog heterofilnog infiltrata i fibroze (Chin i saradnici, 2003).

Kod oboljenja roditeljskih ćuraka u Americi prouzrokovanog ornitobakterijumom, histopatološki nalaz u plućima karakterisao se prisustvom fibrinožno-heterofilnog eksudata u lumenu parabronhija i atrijske i između vazдушnih kapilara. Bakterije su retko uočavane u eksudatu. Ponegde su se mogla uočiti ognjišta fibrinožno-gnojnog zapaljenja, koja su se sastojala iz infiltrata velikog broja

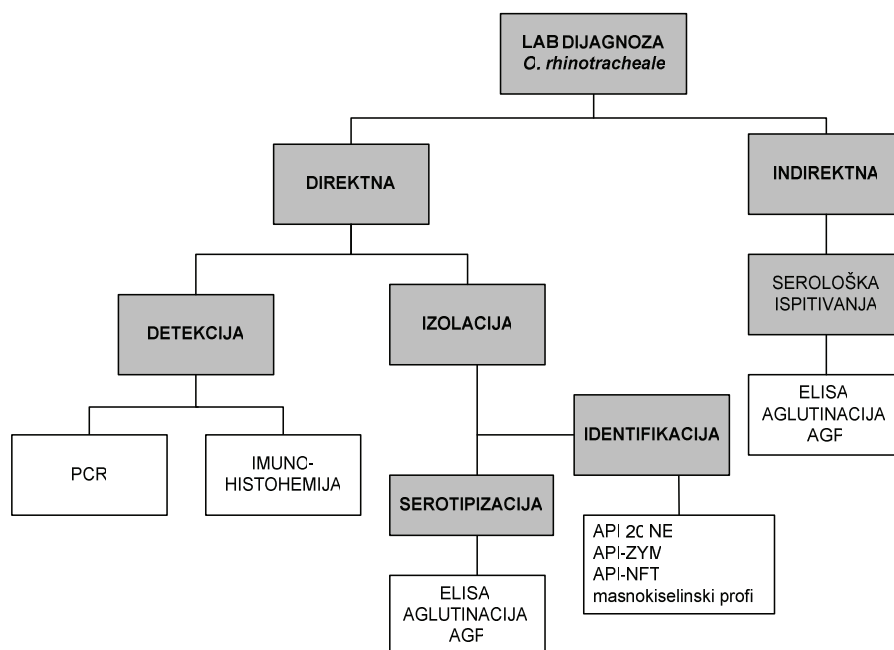
degranulisanih heterofila pomešanih sa nekrotičnim detritusom i heterofila raštrkanih u parabronhijama. Pojedina ognjišta bila su okružena višejedarnim džinovskim ćelijama i sadržavala su gram-negativne bakterije. Pleura je bila zadebljala zbog fibrinozno-heterofilne infiltracije. U većini slučajeva pluća su imala izražen perivaskularni i intersticijalni edem uz infiltraciju heterofilima i po nekim limfocitom. Ponegde se u velikim arterijama intersticijuma mogla zapaziti blaga proliferacija endotela, vakuolizacija citoplazme i infiltracija endotelnog sloja heterofilima. Zidovi vazdušnih kesa su bili zadebljali kao posledica fibrinozno-gnojnog zapaljenja.

Nalaz u jetri karakterisalo je prisustvo akutne koagulacione nekroze uz trombozu pojedinih krvnih sudova, naročito na periferiji jetrinih lobusa. Na periferiji nekrotičnih područja uočavane su degenerativne promene. Kod nekoliko ćuraka na periferiji jetre je uočeno multifokalno propadanje hepatocita uz prisustvo serofibrinoznog eksudata u kome se nalazio mali broj heterofila. Kod nekoliko ćuraka nađena je hiperemija nazalnih sinusa, slezine, bubrega i serofibrinozni eksudat u vaskularnim sinusima slezine (De Rosa i saradnici, 1996).

Eksperimentalnim inficiranjem ćuraka ornitobakterijumom intratrahealno, prouzrokovana je izrazita hiperemija pluća. Parabronhije i vazdušni kapilari bili su ispunjeni fibrinom, heterofilima, makrofagima i malim brojem gram-negativnih, štapićastih bakterija. Pleura većeg broja ćuraka bila je prekrivena debelim omotačem koji se sastojao iz fibrina, heterofila i makrofaga. Kod ćuraka žrtvovanih sedam dana nakon inficiranja u parabronhijama su se nalazile nakupine fibrina, oivičene spljoštenim epitelnim ćelijama i infiltrovane fibroblastima, makrofagima i heterofilima. U intersticijumu pluća nađena su multipla ognjišta koja su se sastojala iz nekrotičnog detritusa okruženog višejedarnim džinovskim ćelijama, makrofagima i po nekim heterofilom (Sprenger i saradnici, 1998).

## **2.11. Laboratorijska dijagnoza**

Klinički znaci i patoanatomske promene su od malog značaja za postavljanje dijagnoze pošto se i kod mnogih drugih infektivnih oboljenja javlja slična klinička slika i slične patoanatomske promene. Dijagnoza se može postaviti primenom direktnih i indirektnih metoda. Direktna metoda dokazivanja uzročnika su imunohistohemijska metoda, molekularne metode (PCR) i izolacija uzročnika, a indirektna metoda su serološke metode kojima se dokazuju specifična antitela za uzročnika (shema 2) (Hafez, 2002).



**Shema 2. Laboratorijska dijagnoza *O. rhinotracheale* (Hafez, 2002)**

### 2.11.1. Detekcija bakterija

Za detekciju bakterija mogu se koristiti PCR i imunohistohemijske metode. Metoda PCR može se izvoditi upotrebom kombinacije prajmera OR16S-F1 (5'-GAG AAT TAA TTT ACG GAT TAA G) i OR 16S-R1 (5'- TTC GCT TGG TCT CCG AAG AT). Ova kombinacija umnožava fragment od 784 bazna para na 16S rRNK genu ornitobakterijuma, ali ne i kod srodnih bakterija sa kojima se on može zameniti (Hafez i Beyer, 1997; van Empel, 1998a; Hung i Alvarado, 2001). U budućnosti bi PCR mogao biti prilagođen za dokazivanje *O. rhinotracheale* u trahealnim brisevima, jajima i uzorcima iz ambijenta (Hafez, 2002).

Primenom imunohistohemijske metode utvrđeno je da je *O. rhinotracheale* prisutan u 70% slučajeva oboljenja sa ispoljenim respiratornim simptomima kod brojlera, dok se bakteriološki i/ili serološki samo 30% slučajeva sa respiratornim simptomima može dovesti u vezu sa *O. rhinotracheale* (van Empel i saradnici, 1999; van Veen i saradnici, 2000a; Hafez, 2002).

### 2.11.2. Izolacija

Uzorke za bakteriološko kultivisanje treba uzeti u ranom stadijumu bolesti. *O. rhinotracheale* se može izolovati iz traheje, trahealnih briseva, pluća i vazdušnih kes. Pokušaji izolacije uzročnika iz krvi, srca i jetre nisu dali rezultate (Hafez i saradnici, 1993). Međutim, izolacija je bila uspešna iz ovih organa, pa čak i iz zglobova, mozga, jajnika i jajovoda eksperimentalno inficiranih ptica (van Beek i saradnici, 1994; Back i saradnici, 1998b). Za primarnu izolaciju obično se koristi krvni agar sa 10% ovčije krvi. Ploče se inkubiraju na temperaturi od 37° C tokom 48 časova, pod anaerobnim ili mikroaerofilnim uslovima. *O. rhinotracheale* dobro raste i na triptonom-soja agaru kao i u peptonskoj vodi i pasterela bujonu pod aerobnim i anaerobnim uslovima. U uzorcima kontaminiranim brzo-rastućim bakterijama kao što su *E. coli*, *Proteus* ili *Pseudomonas* dešava se da prerastu *O. rhinotracheale* kolonije, pa one ne bivaju otkrivene u rutinskoj dijagnostici. Pošto je potvrđeno da je većina izolata *O. rhinotracheale* rezistentna na gentamicin preporučuje se upotreba 10 µg gentamicina po mililitru podloge da bi se sprečio rast drugih bakterija iz kontaminiranih uzoraka i omogućila izolacija *O. rhinotracheale* (Hafez i saradnici, 1993; Back i saradnici, 1998b). Kao efikasna selektivna podloga navodi se krvni agar sa dodatkom 5 µg gentamicina i polimiksina po mililitru podloge (van Empel, 1997).

### 2.11.3. Identifikacija

Na krvnom agaru kolonije su male, sivo-bele, neprozirne, nehemolitične i variraju u prečniku od 1 do 3 mm. *O. rhinotracheale* je gram-negativni pleomorfni štapić. Ne raste na „MacConkey“ agaru. Proizvodi oksidazu ali ne i indol. Svi izolati su galaktozidaza (ONPG) pozitivni, katalaza negativni i većina njih daje pozitivnu reakciju u ureaza testu (Hafez, 2002). Međutim, Günther i saradnici (2002) izolovali su i identifikovali citohrom-oksidaza negativan soj *O. rhinotracheale* iz ćuraka.

Nakon inkubacije u mikroaerofilnim uslovima u trajanju od 48 h ne stvara zonu hemolize. Međutim, oko kolonija izraslih na agaru sa dodatkom ovčije, kozje ili konjske krvi, nakon inicijalne inkubacije pod mikroaerofilnim uslovima, na sobnoj temperaturi u aerobnoj sredini može da se razvije zona hemolize (Tabatabai i saradnici, 2010; Gornatti Churria i saradnici, 2011).

Na osnovu biohemijske identifikacije upotrebom komercijalnog test-kita (API 20 NE, bioMérieux, Francuska ili API 20 NFT, SAD) utvrđeno je da 99,5% sojeva



posедује šifre 022 000 4 (61%) ili 002 000 4 (38,5%) (van Empel, 1998a). Dalja identifikacija bi mogla da se sprovede upotrebom „API ZYM“, ili masnokiselinskog profila (Charlton i saradnici, 1993). Drugi komercijalni identifikacioni sistem „RapID NF Plus“ sistem (Innovative Diagnostics, USA), dao je pouzdane rezultate u identifikaciji (šifre: 4-7-2-2-6-4, 4-7-6-2-6-4, 6-7-6-2-6-4 ili 6-7-2-2-6-4) 110 ispitanih sojeva (Post i saradnici, 1997, 1999).

#### **2.11.4. Tipizacija izolata**

##### **Serološka tipizacija**

Potvrda pripadnosti izolata određenom serološkom tipu može se izvršiti primenom poznatog pozitivnog antiseruma u agar-gel precipitacionom testu (AGP), ELISA testa (van Empel, 1998a; Hafez i Sting, 1999) ili brze aglutinacije (Bock i saradnici, 1997; Back i saradnici, 1998a). Otkriveno je ukupno 18 serotipova koji su označeni latiničnim slovima od A do R (van Empel, 1998a). Većina izolata poreklom od pilića pripada serotipu A, dok su izolati poreklom od ćuraka heterogeniji i pripadaju serotipovima A, B i D (van Empel i saradnici, 1996; Hafez, 1998a; van Empel, 1998a).

##### **Molekularno-biološka tipizacija**

Dalju tipizaciju moguće je vršiti pomoću PCR metode ili korišćenjem RAPD-DNK (*random-amplified-polymorphic DNA*). Upotrebom prajmera M13 (5'-TAT GTA AAA CGA CGG CCA GT-3) i ERIC 1R (5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3') nađene su varijacije između svih testiranih serotipova, zbog čega se metoda smatra pogodnom za tipizaciju i epizootiološko istraživanje izolata *O. rhinotracheale*.

Upotrebom pulsne elektroforeze (*pulsed-field gel electrophoresis* - PFGE) mogu se otkriti razlike između 17 standardnih serotipova (A-Q). Međutim, ispitivanjem terenskih izolata serotipa A poreklom od ćuraka iz Nemačke zapažaju se varijacije, dok su izolati B serotipa identični. Poređenjem izolata iz različitih zemalja uočena je velika sličnost između izolata istog serotipa bez obzira da li su poticali od pilića ili ćuraka. Rezultati ukazuju na postojanje veze između geografskog porekla i serotipa (Popp i Hafez, 2001).



### 2.11.5. Serološka ispitivanja

Serološko ispitivanje prisustva antitela može se sprovoditi upotrebom testa brze aglutinacije pripremljenog od različitih serotipova, ELISA testa ili DIA testa (DOT - *immunobinding assay*) (Bock i saradnici, 1997; Back i saradnici, 1998a; Hafez, 2002). Specifičnost ELISA testa za otkrivanje određenog serotipa zavisi od primenjenog metoda za ekstrakciju antigena koji se nanosi na ploče. Antigeni koji se ekstrahuju kuvanjem su serotipski specifični (van Empel i saradnici, 1997), dok antigeni dobijeni ekstrakcijom pomoću sodium dodecil sulfata (SDS antigeni) daju više unakrsnih reakcija (Hafez i Sting, 1999). Nekomercijalni ELISA test (dobijen SDS ekstrakcijom), kao i dva komercijalna, dostupna ELISA kita (Biocheck i IDEXX) mogu da detektuju antitela protiv svih testiranih serotipova *O. rhinotracheale*. Ispitivanjem uzoraka seruma prikupljenih od komercijalnih jata dobijeni su slični rezultati primenom sva tri testa (Ballagi i saradnici, 2000; Hafez i saradnici, 2000). Upotrebom ELISA testa, antitela protiv *O. rhinotracheale* se mogu detektovati u serumu pilića nekoliko dana nakon inficiranja, a vrednosti titra antitela dostižu najviše vrednosti između 1. i 4. nedelje posle inficiranja (van Empel i saradnici, 1996). Pošto titar antitela brzo opada nakon dostizanja maksimalne vrednosti, uzorke seruma za skrining ispitivanja trebalo bi kontrolisati u kraćim vremenskim intervalima. Prednost seroloških testova u odnosu na bakteriološka ispitivanja je u tome što antitela perzistiraju nekoliko nedelja nakon infekcije, a bakterije se kratko zadržavaju u organizmu.

Međutim, na izlučivanje *O. rhinotracheale* i imunski odgovor mogu da utiču razni faktori, kao što su antibiotska terapija i vakcinacija. Uticaj terapije antibioticima na serološki odgovor protiv *O. rhinotracheale* nije razjašnjen. Popp i Hafez (2002) su sprovedli istraživanje sa ciljem da utvrde efekat medikamentozne terapije amoksicilinom na kinetiku antitela. Amoksicilin je efikasan protiv većine izolata testiranih u uslovima *in vitro* (Hafez i saradnici, 1993). Tri grupe od po 10 SPF nosilja su inficirane intravenski sojem *O. rhinotracheale* ( $5 \times 10^8$  CFU) sa 36 nedelja. Grupa 1 bila je kontrolna, inficirana je ali nije tretirana amoksicilinom. Grupa 2 bila je inficirana i tretirana je odmah, amoksicilinom u dozi od 250 ppm kroz vodu za piće tokom 5 dana. Grupa 3 bila je inficirana i tretirana amoksicilinom 7 dana nakon inficiranja u dozi od 250 ppm kroz vodu za piće tokom 5 dana. Grupa 4 bila je dodatna kontrolna grupa koja nije inficirana niti tretirana antibiotikom. Uzorci krvi prikupljeni su u petodnevним intervalima do 50. dana od inficiranja i ispitani ELISA testom na prisustvo antitela protiv *O. rhinotracheale*.

Rezultati su pokazali da antibiotski tretman neposredno po inficiranju ne utiče na imunski odgovor, dok tretman sproveden 7 dana nakon inficiranja ima za posledicu slabiji imunski odgovor, odnosno niži je nivo antitela u odnosu na kontrolnu grupu inficiranih, a nelečenih pilića.

#### 2.11.6. Diferencijalna dijagnoza

Respiratorna oboljenja živine uzrokuju razne vrste virusa, bakterija i gljivica (shema 1). Za postavljanje laboratorijske dijagnoze, koja podrazumeva izolaciju i identifikaciju *O. rhinotracheale*, bitno je poznavati osobine i drugih bakterija, koje su značajne za diferencijalnu dijagnozu (tabela 3). U diferencijalnoj dijagnostici respiratornih oboljenja ptica značajno je nekoliko bakterijskih vrsta iz roda *Pasteurella* (*P. multocida*, *P. gallinarum*, *P. haemolytica*), *Riemerella anatipestifer*, *Yersinia pseudotuberculosis* (uzročnik pseudotuberkuloze koja je ranije pripadala rodu *Pasteurella*), *Bordetella avium* i *Haemophilus paragallinarum* (Hafez, 2002).

**Tabela 3. Različite karakteristike nekih bakterija uzročnika respiratornih oboljenja živine**

TEST	REZULTAT ZA BAKTERIJSKE VRSTE:							
	O.r	P.m	R.a	P.g	P.h	Y.p	B.a	H.p
hemoliza	-	-	-	-	+			-
MacConkey agar	-	-	-	-	-	+/-	+	-
oksidaza	+	+	+	+	+	-	+	-
galaktozidaza (ONPG)	+	+/-	-	+/-	-	+		+
indol	-	+	+/-	-	-	-		-
ureja	+/-	+	+/-	+	+	+	-	-
arginin dihidrolaza	-/+	-	+	-			-	-
redukcija nitrata	-	+	-	+	+	+/-	-	+
katalaza	-	+	+	+	+	+		-
laktoza	-/+	+/-	-	-	+/-	-		-
maltoza	-/+	-/+	-	+	+	+		+
galaktoza	-/+	+	-	+		+		-
fruktoza	-/+	+	-	+		+		+

O.r = *Ornithobacterium rhinotracheale*; P.m = *Pasteurella multocida*; R.a = *Riemerella anatipestifer*;

P.g = *Pasteurella gallinarum*; P.h = *Pasteurella haemolytica*; Y.p = *Yersinia pseudotuberculosis*;

B.a = *Bordetella avium*; H.p = *Haemophilus paragallinarum* (Hafez, 2002)

## 2.12. Pojava infekcije u pojedinim zemljama

U Evropi se *O. rhinotracheale* često opisuje kao uzročnik blagih do srednjih respiratornih problema i iznenadnih, akutnih uginuća. Osnovni znaci infekcije su: mukozni iscedak iz nosa, suzenje, otok infraorbitalnih sinusa i smanjen prirast (van Empel i Hafez, 1999).

U Holandiji se od novembra 1999. godine javljaju povećani finansijski gubici na nekoliko brojlerskih farmi kao posledica velikog broja odbačenih trupova na klanici, sa najupečatljivijim nalazom gnojnog aerosakulitisa. Procenat gubitaka na klanici iznosio je od 5 do 10%, ali je zabeležen slučaj da je odbačeno čak 90% trupova.

Van Veen i saradnici (2000a) opisuju jedan ovakav slučaj sa gubicima na klanici od 60%. Klanici je isporučeno 37.110 brojlera, starih 42 dana, od kojih je 265 uginulo već u toku transporta. Inspekcijskim pregledom pilića po prispeću na klanicu ustanovljeni su znaci bolesti. Od ukupnog broja isporučenih brojlera, 22.101 trup je odbačen zbog ascitesa, poliserozitisa i drugih intraabdominalnih promena. Kod nekoliko pilića uočen je dermatitis, sinovitis, artritis i/ili perikarditis. Sa klanice je upućeno 150 živih pilića i 150 trupova na patoanatomsku analizu u Deventer („*Animal health servis*“). Na živim pilićima zapaženi su klinički simptomi u vidu kijanja, nazalnog iscetka i lakrimacije. Iz anamneze se došlo do saznanja da su pilići ispoljavali blage respiratorne simptome od 28. dana života. Ukupno je useljeno 41.000 brojlera u tri odvojena objekta. Vakcinisani su protiv atipične kuge peradi, infektivnog bronhitisa i Gamboro bolesti. Antibiotici nisu primenjivani uprkos mortalitetu od 3,3% u prvih 10 dana tovnog perioda. Do 28. dana proizvodni rezultati su bili dobri. Prosečna telesna masa 28. dana iznosila je 1156 g, a 41. dana 1700 g. Stopa mortaliteta iznosila je 0,12-0,85% dnevno.

Patoanatskim ispitivanjem utvrđeno je prisustvo fibrinozno-gnojnog aerosakulitisa kod 84% ispitanih pilića, a kod nekoliko leševa i prisustvo perikarditisa i pneumonije.

Serološkim analizama utvrđen je visok titar antitela na IBV koji se dovodi u vezu sa prirodnom infekcijom, a titar antitela na *O. rhinotracheale* odgovarao je akutnoj infekciji. Od 24 pileta sa izraženim patoanatskim promenama uzorkovani su organi (vazdušne kese, pluća, kosna srž) za bakteriološka ispitivanja. *O. rhinotracheale* je izolovan iz 20 uzoraka vazdušnih kesa, a *E. coli* iz svega 4 uzorka.

Histopatološkim ispitivanjem uočena je infiltracija pluća i vazdušnih kesa limfocitima i heterofilima i fibrinozno-gnojni eksudat u vazdušnim putevima. U

mišićima su zapažene degenerativne promene. Imunohistohemijskim ispitivanjem otkriveno je prisustvo antigena *O. rhinotracheale* u respiratornim organima, tetivama i aponeurozama (van Veen i saradnici, 2000a).

Odor i saradnici (1997) opisali su pojavu oboljenja na poluostrvu Delmarva u 11 brojerskih jata u starosti od 36 do 66 dana (prosečna starost 46 dana). U trenutku ispitivanja iz anamneze je bilo poznato da su tokom tova u ovim jatima bili povećani morbiditet i mortalitet i da je na klanici odbačen veći broj trupova od uobičajenog, mada precizni podaci nisu bili poznati. U obolelim jatima dijagnostikovani su i IBV, lentogeni NDV i virus infektivnog laringotraheitisa (*laryngotracheitis virus* - LTV).

Ispitivanja su preduzeta na zahtev kompanija - vlasnika farmi, zbog klinički ispoljenog respiratornog oboljenja i povećanog dnevnog mortaliteta. Stopa mortaliteta iznosila je 2-4 piletu na hiljadu (očekivana dnevna stopa mortaliteta je 0,5 na hiljadu u toj fazi uzgoja).

Od patoanatomskih promena zapažen je aerosakulitis koji se manifestovao prisustvom tečnog, penušavog sadržaja žute do bele boje i kazeoznog sadržaja u vazдушnim kesama. Kod leševa iz nekoliko jata bila je prisutna pneumonija, u većini slučajeva unilateralna, a na leševima iz jednog jata nađena je izrazita bilateralna konsolidacija pluća. Kod nekih pilića cela pluća su bila zahvaćena, a kod drugih samo deo organa. Oko pluća, uz zid grudnog koša uočene su nakupine fibrina, a opisana je i pojava pleuralnog eksudata. Šest od jedanaest jata ispitano je histopatološki.

Od histopatoloških promena utvrđen je slabo do srednje izražen limfocitni traheitis sa difuznom hiperplazijom epitela, hiperemijom, gubitkom cilija, akutni difuzni gnojni aerosakulitis i akutna fibrinozna pleuropneumonija.

Od 11 ispitanih jata u sedam je izolovan virus: u tri jata IBV, u jednom jatu lentogeni NDV, u dva jata LTV i u jednom jatu adenovirus. Izolati IBV-a nisu bili serotipizirani, a poreklo LTV-a nije bilo poznato.

Iz svih 11 obolelih jata izolovan je *O. rhinotracheale*, a iz 7 jata i *E. coli*. Ni u jednom slučaju antibiotici nisu primenjivani pre laboratorijskih ispitivanja. Antibiotogram ukazuje na osetljivost uzročnika na tetraciklinine, eritromicin, sarafloksacin, novobiocin, nalidiksinsku kiselinu, linkomicin i bacitracin.

Aerosakulitis koji je zapažen u ovim slučajevima infekcije prouzrokovane virusom infektivnog bronhitisa razlikovao se od do tada poznatih slučajeva u kojima je *E. coli* uzrokovala sekundarnu infekciju. Masivni aerosakulitis sa prisustvom penušavog sadržaja bele do žute boje sa kazeoznim ostrvcima i unilateralna pleuropneumonija

odgovarali su nalazu koji su opisali Van Beek i saradnici (1994) kao posledicu infekcije ornitobakterijumom. Nasuprot tome navedeni autori opisuju i enteritis koji se u ovim slučajevima nije javljao (Odor i saradnici, 1997).

U martu 1997. godine u SAD-u (na srednjem zapadu) javili su se problemi na farmi koja se sastojala iz osam proizvodnih jedinica od po 127.000 komercijalnih nosilja. Proizvodnja jaja u jatu A u starosti od 34 nedelje, opala je za 10% u sedam dana. Uočena je niska incidencija otoka sinusa ( $< 0,1\%$ ) i otežano disanje kod malog broja kokoši. Beleži se i pojava deformisanih jaja, ali manje od 1% ukupne proizvodnje. Mortalitet koji se kretao od 15 do 20 kokoši dnevno (0,1% nedeljno), povećao se na 30 kokoši dnevno (0,2-0,3% nedeljno).

Patoanatomski nalaz karakterisao se prisustvom sinuzitisa i peritonitisa. Iz infraorbitalnih sinusa izolovan je *O. rhinotracheale*-serotip C. Iz unutrašnjih organa leševa izolovane su i druge bakterije: *E. coli*, *Streptococcus* sp. i bakterije opisane kao „slične pastereli“.

U narednih šest nedelja došlo je do pada proizvodnje i povećanja mortaliteta i u 5 drugih proizvodnih jedinica (B-F). Nekoliko nedelja od izbijanja oboljenja proizvodnja jaja je bila smanjena i nikada nije dostigla očekivane vrednosti, a stopa mortaliteta bila je povećana duže vreme. U početnoj fazi oboljenja izolovan je IBV. Međutim autori smatraju da neočekivano dug period smanjene proizvodnje kao i stopa mortaliteta nisu uobičajeni za infekciju prouzrokovanu IBV-om i navode da je u ovom slučaju uloga *O. rhinotracheale* mogla biti veoma značajna (Sprenger i saradnici, 2000).

El-Gohary i Awaad (1998) izveštavaju o pojavi oboljenja prouzrokovanog ornitobakterijumom u Egiptu, praćenog respiratornim znacima uz depresiju, anoreksiju, smanjen prirast i povišen procenat mortaliteta.

U južnoj Africi *O. rhinotracheale* je uzrokovao značajne ekonomske gubitke koji su posledica odbacivanja trupova na klanicama usled hroničnih aerosakulitisa i peritonitisa (Travers i saradnici, 1996).

Sakai i saradnici (2000) izveštavaju o pojavi oboljenja u Japanu gde je *O. rhinotracheale* doveden u vezu sa oboljenjem brojlera u starosti od sedam do devet nedelja koje se manifestovalo blagim kijanjem, dijarejom sa zelenim izmetom i tremorom glave. Mortalitet je bio povećan preko 10%.

Rahimi i Banani (2007) opisali su pojavu ornitobakterioze kod brojlera na zapadu Irana. Respiratorni simptomi počeli su kijanjem u starosti od 27 dana, a zatim se pojavio nazalni iscedak, suženje otok infraorbitalnih sinusa i otežano disanje. Bolest je trajala do kraja tovnog perioda, nepovoljno se odrazila na proizvodne rezultate, a mortalitet je iznosio 13,6%. Patoanatomskim pregledom nađen je traheitis, aerosakulitis i pneumonija. Najupečatljiviji je bio nalaz, penušavog, belog eksudata u traheji i vazдушnim kesama. Histopatološkim pregledom zapaženo je zadebljanje perikardijuma usled infiltracije makrofagima i heterofilima. Vazdušne kese su bile edematozne i infiltrovane heterofilima. Pluća su bila hiperemična i infiltrovana makrofagima i heterofilima, a u lumenu parabronhija nalazila su se nekrotična ognjišta. Traheitis se manifestovao hiperemijom i infiltracijom epitela i lamine proprije heterofilima i makrofagima. Bakteriološkim ispitivanjem izolovan je *O. rhinotracheale* iz traheje, pluća i vazдушnih kesa bolesnih ptica. Na osnovu kliničkog pregleda, patomorfološkog i laboratorijskih ispitivanja smatra se da je *O. rhinotracheale* primarni prouzrokovatelj respiratorne infekcije na ovoj farmi.

U dva susedna jata brojlera sa jednog velikog farmskog kompleksa u Buenos Airesu, u Argentini, u starosti od 40 i 46 dana, javili su se simptomi u vidu kijanja, nazalnog iscetka, facijalnog edema, depresije i smanjenog uzimanja hrane i vode. Mortalitet je bio povišen preko 10%. Patoanatomskim pregledom nađena je pneumonija i zamućenje zidova torakalnih i abdominalnih vazдушnih kesa u kojima se nalazio penušavi eksudat. Histopatološkim ispitivanjem, kod pilića iz oba jata utvrđena je fibrinozno-gnojna pneumonija. Iz uzoraka traheje i pluća izolovan je *O. rhinotracheale* koji je posle inkubacije u mikroaerofilnoj sredini, na sobnoj temperaturi, u aerobnim uslovima ispoljio  $\beta$ -hemolitičku aktivnost (Gornatti Churria i saradnici, 2011).

Hinz i saradnici (1994) opisuju pojavu ovog oboljenja u Nemačkoj, 1992. godine, kod tovnih ćuraka u starosti od 23 nedelje. Ćurke su bile vakcinisane protiv atipične kuge i pastereleze i bile su serološki negativne na *Mycoplasma* spp. U ovom slučaju mortalitet je iznosio 5,6%, a morbiditet 16,6%. Klinički znaci (slabost, dispnoja, zevanje i iskašljavanje krvavo-sluzavog sadržaja) zapaženi su samo kratko vreme (nekoliko sati) pre smrti.

Pojavu ove infekcije kod ćuraka u Mađarskoj pratili su različiti klinički znaci u različitim jatima. U četiri jata u starosti od 2 do 3 nedelje javili su se simptomi u vidu

rinitisa, traheitisa, konjunktivitisa i povišen mortalitet. U jednom jatu u starosti od 15 do 16 nedelja kod uginulih ptica, patoanatomski nalaz je karakterisala bilateralna kataralno-krupozna pneumonija. U jednom jatu starom pet nedelja i u tri jata u starosti od 16 do 20 nedelja javili su se nervni simptomi (poremećaj motorike, abnormalno držanje glave, ležanje), kao posledica fibrinozno-gnojnog zapaljenja kostiju glave i meningitisa. U svim opisanim slučajevima iz organa obolelih ćuraka izolovan je *O. rhinotracheale* (Szalay i saradnici, 2002).

U Sloveniji se 1999. godine pojavilo teško respiratorno oboljenje koje se dovodi u vezu sa *O. rhinotracheale*. Ova bakterija je izolovana iz respiratornih organa tovnih ćuraka i brojerskih roditelja. Klinički znaci i patoanatomske promene bili su slični kao kod drugih virusnih i bakterijskih respiratornih infekcija. Najkonzistentnije patoanatomske promene činili su: unilateralna ili bilateralna pneumonija, aerosakulitis i akumulacija fibrina na plućima. Kod kokoši se javljao i ovoforitis. Kod ćuraka su klinički znaci bili izraženiji, a mortalitet je bio viši kod starijih i kod jedinki muškog pola. Kod brojerskih roditelja infekcija je bila izraženija kod kokoši nego kod petlova. Serološkim ispitivanjem ELISA testom 18 jata tovnih ćuraka i 22 jata brojerskih roditelja utvrđeno je prisustvo specifičnih antitela za *O. rhinotracheale* u 77% jata tovnih ćuraka, odnosno 91% jata brojerskih roditelja (Zorman-Rojs, 2000).

U Americi, na srednjem zapadu, opisano je oboljenje kod ćurana u jatu starom 22 nedelje, koje je u naredna tri dana trebalo da bude upućeno na klanje. Od kliničkih znakova zapaženi su depresija, kašalj i prisustvo krvi oko kljuna i nosnih otvora. Od pojave prvih simptoma mortalitet je rastao dostigavši 5,9% u toku nekoliko dana, pre nego što je jato upućeno na klanje. U ovom periodu i na drugim okolnim farmama obolela su jata tovnih ćuraka u starosti od 14 do 22 nedelje i jata ćurana na tri farme roditeljskih ćuraka, pri čemu je mortalitet bio povišen kao posledica pneumonije. Na farmi su izvršene obdukcije i organi 5 leševa (pluća i jetre) prosleđeni su na histopatološko i bakteriološko ispitivanje, a krv je uzorkovana za serološki pregled.

Patoanatomskim pregledom utvrđeno je da su mišićni i žlezdani želudac prazni, jetre normalnog izgleda, a pluća zacrvenjena i vlažna. Obično je jedno plućno krilo bilo više zahvaćeno. Pleura je na toj strani prekrivena bistrim, lepljivim eksudatom. Histopatološkim ispitivanjem utvrđena je difuzna fibrinozno-gnojna pneumonija i pleuritis u svim pregledanim organima (5 pluća). Vazdušni putevi bili su ispunjeni



fibrinom, heterofilima i makrofagima. Na tri od pet pregledanih jetri zapažena je multifokalna bilijarna hiperplazija, nekrotična i inflamatorna ognjišta.

Iz svih pet uzoraka pluća izolovana je čista kultura *O. rhinotracheale*. Ni iz jednog uzorka jetre nije izolovana ova bakterija. Serološkim ispitivanjem nisu utvrđena antitela na mikoplazme, paramiksovirus tip 2 i tip 3 (*paramyxoviruses* - PMV) niti na virus avijarne influence (*avian influenza virus* - AIV) (Roepke i saradnici, 1998).

Prvi publikovan slučaj infekcije ćuraka prouzrokovane *O. rhinotracheale* u Kanadi datira iz 1998. godine (Ontario). U jatu od 10.000 ćurana u starosti od 14 nedelja, došlo je do povećanja mortaliteta (u dva dana uginulo je oko 1% ćurana). Od kliničkih znakova opisuje se neveselost i teško disanje.

Najkonzistentnije patoanatomske promene zapažene su na plućima u vidu bilateralnog otoka, hiperemije i konsolidacije. Kod mnogih ćuraka površina pluća, naročito dorzalna strana bila je prekrivena žuto-belim fibrinoznim eksudatom. Na plućima pojedinih leševa uočena su žuta nekrotična područja. Kod oko 30% leševa uočen je fibrinozni perikarditis, a kod nekoliko ćuraka bio je prisutan aerosakulitis (češće na grudnim vazdušnim kesama). Jetra nekoliko leševa bila je hiperemična. Na osnovu kliničkih i patoanatomskih promena postavljena je sumnja na *O. rhinotracheale*. Organi uginulih ćuraka poslani su na histopatološko, bakteriološko i virusološko, a krv na serološko ispitivanje.

Histopatološkim ispitivanjem pluća ustanovljena je difuzna fibrinozno-gnojna pleuropneumonija. Iz pluća uginulih ćuraka izolovan je *O. rhinotracheale*.

Izolat je bio osetljiv na eritromicin i tetraciklin, intermedijarno osetljiv na penicilin, a otporan na trimetoprim-sulfametoksazol. Serološkim ispitivanjem u serumima nije utvrđeno prisustvo antitela na *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. meleagridis*, AIV i PMV (tip 1, 2, 3 i 6), niti su izolovani virusi na pilećim embrionima (Abdul-Aziz, 1999).

Kasnije je opisana i pojava ovog oboljenja u Kvebeku koje se pojavilo još ranije, u proleće 1997. godine. U tri jata velikih belih hibridnih ćuraka nosilja, javili su se ozbiljni respiratorni problemi u starosti od 52 nedelje. Ćurke su pokazivale znake depresije, dispnoje, kašlja, nazalnog iscetka, a u nekim slučajevima javljala su se iznenadna uginuća. U najkritičnijem periodu mortalitet je dostizao 1,4-7% nedeljno. U svim jatima došlo je do pada nosivosti u trajanju od najmanje četiri nedelje (Joubert i saradnici, 1999).



De Rosa i saradnici (1996) opisali su pojavu respiratornog oboljenja u Americi na tri susedna ranča roditeljskih ćuraka u intervalima od oko dve nedelje. Poslednja dva zahvaćena ranča bila su na udaljenosti od 11 km i pripadala su različitim kompanijama. Mortalitet na poslednjem ranču bio je naročito izražen u pojedinim izdvojenim grupama ćuraka: kod ćurana, utovljenih ćuraka i ćuraka izloženih stresu (veštačko osemenjavanje). Na tom ranču procenat mortaliteta u periodu od 18 dana iznosio je 5,2% kod ćurana, 2,4% kod ćuraka, 7,4% kod utovljenih ćurana i 5,4% kod utovljenih ćuraka. Tokom trajanja oboljenja ispitane su ćurke u starosti od 27 do 42 nedelje.

Od patoanatomskih promena zapažen je fibrinozni aerosakulitis, uvećanje jetre i slezine, petehije na epikardu, prisustvo zamućene tečnosti u perikardijumu, konsolidacija pluća i fibrinozni eksudat na pleuri.

Histopatološki nalaz karakterisalo je fibrinozno-gnojno zapaljenje vazdušnih puteva, pleure, vazdušnih kesa i perivaskularni intersticijalni edem pluća. U jetri je utvrđena akutna koagulaciona nekroza hepatocita sa mestimičnom trombozom na periferiji jetrinih lobusa.

Iz respiratornih organa: infraorbitalnih sinusa, traheje, pluća i vazdušnih kesa izolovan je *O. rhinotracheale*. Pokušaj izolacije iz ostalih organa (jetre, slezine i kosne srži) nije dao rezultate. *E. coli* izolovana je iz respiratornih organa, mada sa manjom učestalošću.

## **2.13. Serološka ispitivanja prisustva uzročnika u pojedinim zemljama**

Prisustvo uzročnika u intenzivnoj brojlerskoj proizvodnji dokazano je indirektno, serološkim metodama u mnogim zemljama. Ovde se navodi samo nekoliko primera dokazivanja uzročnika u brojlerskim jatima sa tri različita kontinenta kako bi se skrenula pažnja na globalni karakter infekcije.

Chansiripornchai i saradnici (2007) ispitivali su prisustvo specifičnih antitela za *O. rhinotracheale* u 19 brojlerskih jata u starosti od 30 do 45 dana na Tajlandu i utvrdili prisustvo antitela u 12 jata. Od 280 pojedinačnih seruma brojlera (iz 19 jata) pozitivno je reagovalo 19,6% uzoraka.

Canal i saradnici (2003) ispitivali su prisustvo antitela na uzročnika u 50 brojlerskih jata (ukupno 1550 pojedinačnih uzoraka) u južnom Brazilu. Prisustvo antitela ustanovljeno je u 63,83% jata, a pozitivno je reagovalo u proseku 6,52% pojedinačnih uzoraka po jatu.

Hafez i Sting (1996) sprovedli su ispitivanje prisustva antitela na uzročnika u Nemačkoj i ustanovili 26% seropozitivnih jata brojlera.

Ryll i saradnici (1997) takođe su ispitivali prisustvo antitela na *O. rhinotracheale* u Nemačkoj. Ispitivanjem 332 pojedinačna seruma, sa 22 farme iz 25 brojlerskih jata utvrdili su 9,4% seropozitivnih pojedinačnih uzoraka odnosno 13,2% seropozitivnih jata.

U Republici Srbiji sprovedeno je ispitivanje rasprostranjenosti infekcije kojim je obuhvaćeno 26 jata brojlera sa različitih farmi iz pet opština. Specifična antitela za uzročnika utvrđena su u 43 od 430 ispitanih uzoraka krvi brojlera iz 16 jata različite starosti. Rezultati pokazuju da je infekcija rasprostranjena u većini brojlerskih jata (61,54%) i da je u proseku relativno mali broj pilića po jatu inficiran - 10% (Gavrilović, 2009).

## **2.14. Eksperimentalna infekcija**

Uloga *O. rhinotracheale* u kompleksnoj patologiji respiratornog sistema živine još uvek nije u potpunosti razjašnjena. Rasvetljavanju te uloge doprinose brojni eksperimenti čiji je osnovni cilj da se utvrdi da li je *O. rhinotracheale* uzročnik respiratornog oboljenja živine i da li je sposoban sam da izazove infekciju, odnosno da li je primarni patogen. U poglavlju „Patogeneza“ opisan je eksperiment koji ukazuje da *O. rhinotracheale* uzrokuje minimalne patološke promene kod pilića nakon inficiranja aerosolom, dok su ovom poglavlju opisani i eksperimenti koji su uporište za tezu da je uzročnik primarni patogen.

### **2.14.1. Eksperimentalna infekcija pilića**

Jedan od eksperimenata koji potkrepljuju stav da je *O. rhinotracheale* primarni patogen je eksperiment koji su izveli L. van Veen i saradnici (2000b). Ciljevi ovog eksperimenta bili su da se ispita patogenost, odnosno da li *O. rhinotracheale* ima ulogu primarnog patogena ili sekundarnog oportunističkog patogena; da li postoji razlika u patogenosti između holandskih izolata od 1994/1995. do 1998/1999. i da li postoji razlika u patogenosti između holandskih, južnoafričkih i američkih izolata *O. rhinotracheale*. Ispitivanje je obuhvatalo 6 ogleda u kojima su korišćeni komercijalni brojleri, SPF brojleri i SPF pilići rase leghorn koji su inficirani aerosolom ili intravenski

holandskim izolatima iz 1994/1995. i 1998/1999. godine, južnoafričkim ili američkim izolatima. Pojedine grupe 6 dana pre inficiranja *O. rhinotracheale* inficirane su NDV-om, a pojedine nisu inficirane ni jednim od agenasa (kontrolne grupe).

Patoanatomske ispitivanje vršeno je posle 7 i 14 dana od inficiranja ornitobakterijumom. Promene u traheji utvrđene su kod komercijalnih brojlera i SPF brojlera nakon inficiranja samo ornitobakterijumom, ali su bile izraženije kada su pilići prethodno bili inficirani NDV-om. Promene na vazdušnim kesama i plućima nađene su posle inficiranja različitim sojevima *O. rhinotracheale* aerosolom kod SPF brojlera i komercijalnih brojlera, dok kod SPF leghorn pilića nije bilo lezija na plućima, a promene na vazdušnim kesama su bile manje izražene. Promene su bile jačeg intenziteta u grupama komercijalnih i SPF brojlera koje su prethodno inficirane NDV-om. Infekcija dve grupe SPF brojlera, prouzrokovana intravenskom aplikacijom holandskih izolata iz 1994/1995. i 1998/1999. godine manifestovala se promenama na zglobovima i jetri. Patoanatomske promene posle 14 dana od inficiranja bile su manje izražene nego 7 dana posle inficiranja. Razlike u patogenosti između holandskih sojeva iz 1994/1995. i iz 1998/1999. godine nisu uočene u odnosu na pojavu aerosakulitisa, pneumonije i traheitisa.

Pošto je ovim eksperimentom dokazano da *O. rhinotracheale* nije postao virulentniji u periodu od 1994. do 1999. godine, smatra se da su povećani problemi u vezi sa infekcijom *O. rhinotracheale* u Holandiji mogli da budu posledica ili povećanog broja infekcija i/ili povećane rezistencije uzročnika na antibiotike.

Od značaja je nalaz da *O. rhinotracheale* može da prouzrokuje promene bez prethodne infekcije virusima, iako je potvrđeno da NDV pojačava intenzitet promena koje uzrokuje *O. rhinotracheale*. Promene prouzrokovane eksperimentalnom infekcijom nestaju vrlo brzo što je zapaženo i kod prirodne infekcije.

Eksperimentom je pokazano da postoje razlike u virulentnosti sojeva kao i razlike u prijemčivosti različitih provenijencija pilića. Holandski i južnoafrički sojevi su virulentniji od američkih. Leghorn SPF pilići su manje prijemčivi od brojlera, dok su komercijalni brojleri prijemčivi kao SPF brojleri. Glavni zaključak ovog eksperimenta je da postoje razlike u patogenosti različitih sojeva i da se *O. rhinotracheale* može smatrati primarnim patogenom (van Veen i saradnici, 2000b).

Kilic i saradnici (2009) ispitivali su kliničke simptome i patomorfološke promene kod komercijalnih brojlera, starih 14 dana koji su inficirani putem aerosola *O. rhinotracheale* sojem B3263/91. Od 30 inficiranih pilića kod 3 su se javili klinički

simptomi u vidu otežanog disanja. U poređenju sa pilićima iz kontrolne grupe nedeljni prirast je bio niži što je naročito bilo izraženo 2 nedelje od inficiranja.

Kod pet pilića između 7. i 14. dana od inficiranja zapaženo je nakupljanje male količine sluzi u nosu, larinksu i traheji kao i hiperemija sluznice gornjih respiratornih puteva. Kod pojedinih pilića u plućima su makroskopskim pregledom uočena zelenkasto-crvena ognjišta. Histopatološke promene nađene su u nosu, larinksu, traheji, plućima i vazdušnim kesama. U posteriornom delu nosne šupljine, larinksu i traheji zapažena su mala ognjišta hiperplazije epitela. U pojedinim delovima mukoze nađena je degeneracija, nekroza i deskvamacija epitela. U lamini propriji ustanovljen je edem, hiperemija i krvarenja različitog intenziteta. Čelijski infiltrat sastojao se iz limfocita, makrofaga, heterofila i malo plazma ćelija, a nađena su i fokalna ognjišta akumulacije limfocita. U lumenu nosa, larinksa i traheje nalazio se eksudat od degenerisanih i nekrotičnih epitelnih ćelija, heterofila i eritrocita. U pojedinim delovima pluća u BALT-u zapažena je infiltracija inflamatornim ćelijama, krvarenja i nekroza. U primarnim bronhusima uočena je fokalna hiperplazija epitela, blag peribronhijalni edem, hiperemija i infiltracija limfocitima, makrofagima i malim brojem heterofila i plazma ćelija. Nalaz u vazdušnim kesama karakterisala je fokalna hiperplazija, degeneracija, nekroza i deskvamacija epitela, kao i hiperemija, edem i infiltrat od inflamatornih ćelija u subepitelu. Histopatološke promene nisu nađene u drugim visceralnim organima eksperimentalno inficiranih pilića (Kilic i saradnici, 2009).

#### **2.14.2. Eksperimentalna infekcija ćuraka**

Eksperiment koji je izvela grupa istraživača Fakulteta veterinarske medicine sa univerziteta Minesota (Sprenger i saradnici, 1998) veoma je značajan jer predstavlja prvi primer eksperimentalne infekcije ćuraka prouzrokovane samo ornitobakterijumom (monoinfekcija). Eksperimentom je obuhvaćeno 25 tovnih ćurana, starih 22 nedelje, bakteriološki i serološki negativnih na *O. rhinotracheale* koji su podeljeni u pet grupa. Jedna grupa inficirana je intravenski (I/V) čistom kulturom *O. rhinotracheale*, druga grupa intratrahealno (I/T) čistom kulturom *O. rhinotracheale*, treća grupa inficirana je I/T plućnim homogenizatom u kojem se nalazio uzročnik. Dve grupe su bile kontrolne, aplikovan im je I/V ili I/T sterilni fiziološki rastvor.

Ćurani su posmatrani tokom sedam dana od inficiranja. U tom periodu uginulo je 5 ćurana iz grupe I/T inficirane plućnim homogenizatom, 2 ćurana iz grupe I/T inficirane čistom kulturom i jedan ćuran iz grupe koja je I/V inficirana čistom kulturom.

Uzorci krvi uzimani su sedmog dana nakon inficiranja kada su preživele jedinke eutanazirane.

Nakon 24 h od inficiranja, kod ćurana iz grupe inficirane I/T čistom kulturom *O. rhinotracheale* i grupe inficirane I/T plućnim homogenizatom ispoljili su se simptomi depresije, kašlja i smanjenog uzimanja hrane. Nakon 48 h od inficiranja, nekoliko ćurana iz ove dve grupe, iskašljavalo je krvavu sluz i oni su uginjavali nakon 24 h. Pet dana nakon inficiranja kašalj se povlačio i preživeli ćurani su bili manje depresivni. Ćurani iz kontrolnih grupa nisu ispoljavali kliničke simptome. Ćurani inficirani I/T čistom kulturom *O. rhinotracheale* i ćurani inficirani I/T plućnim homogenizatom imali su statistički značajan gubitak telesne mase u poređenju sa kontrolnim grupama.

Patoanatomskim pregledom leševa uginulih i eutanaziranih ćurana iz ove dve grupe nađen je beličast eksudat u medijalnom očnom uglu kod nekoliko leševa. Vazdušne kese su bile zadebljelih zidova i ispunjene belim do žutim kazeoznim sadržajem. Perikard je kod nekoliko leševa bio hiperemičan, zadebljao, zamućen (neproziran) i ispunjen kazeoznim žuto-belim eksudatom. Pluća su makroskopski opisana kao zacrvenjena, vlažna, teška i prekrivena gustim, beličastim eksudatom.

Mikroskopski, pluća su bila izrazito hiperemična. Parabronhije i vazdušni kapilari bili su ispunjeni fibrinom, heterofilima, makrofagima i malim brojem gram-negativnih, štapićastih bakterija. Pleura je bila prekrivena naslagama koje su se sastojale iz fibrina, heterofila i makrofaga. Kod ćurana eutanaziranih sedmog dana u parabronhijama su se nalazile nakupine fibrina, oivičene spoljštenim epitelnim ćelijama i infiltrovane fibroblastima, makrofagima i heterofilima. U intersticijumu pluća nađena su multipla ognjišta nekrotičnog ćelijskog detritusa okruženog višejedarnim džinovskim ćelijama, makrofagima i po nekim heterofilom. Iz obe grupe ćurana koji su inficirani I/T (kulturom *O. rhinotracheale* i plućnim homogenizatom), *O. rhinotracheale* je izolovan iz pluća četiri od pet ćurana. Sedmog dana, u serumima inficiranih ćurana utvrđeno je prisustvo specifičnih antitela protiv *O. rhinotracheale*, za razliku od kontrolnih grupa.

Klinički znaci koje su ispoljavali eksperimentalno inficirani ćurani (depresija, kašalj i dr.) bili su slični kao kod prirodne infekcije. Patoanatomske promene (nekrotična, fibrinozno-gnojna pneumonija, perikarditis i pleuritis) uočene kod eksperimentalno inficiranih ćurana bile su u tipu promena nađenih kod uginulih ćuraka u terenskim uslovima. Nakon sedam dana od inficiranja ćurani su pokazivali znake oporavka, iako su na obdukciji bili izraženi aerosakulitis i pneumonija.

Ovo je prvi slučaj uspešno izazvanog oboljenja ćuraka u eksperimentalnim uslovima, inficiranjem samo ornitobakterijumom. Autori navode nekoliko faktora koji bi mogli da budu značajni za uspeh ovog eksperimenta.

1. Prvi je odabir ptica koje su praćene tokom odgoja bakteriološki i serološki (ni jedna nije bila u kontaktu sa uzročnikom pre eksperimentalne infekcije).
2. Uzrast koji je odgovarao uzrastu u kom su zabeleženi teži slučajevi oboljenja u terenskim uslovima.
3. Intratrahealno inficiranje može se smatrati značajnim za izazivanje teške pneumonije. Aerosol i inokulacija vazdušnih kesa imali su za posledicu smanjen rast i aerosakulitis (eksperiment koji su izveli van Empel i saradnici, 1996).
4. Četvrti faktor koji može da bude značajan za ispoljavanje bolesti je kultura koja se koristi za izazivanje infekcije (broj pasaža, medijum za rast i doza). Kultivisanje uzročnika na čvrstom medijumu i upotreba bakterija sa manjim brojem pasaža mogli su da utiču na sprečavanje gubitka faktora virulencije. Iako je moguće izazvati bolest manjim brojem bakterija, u opisanom eksperimentu je aplikovano  $10^{10}$  bakterija u čistoj kulturi i  $10^8$  bakterija u plućnom homogenizatu (Sprenger i saradnici, 1998).

#### **2.14.3. Eksperimentalna infekcija pilića i ćuraka**

Van Empel i saradnici (1996) izveli su eksperiment kojim je pokazano da se eksperimentalnim inficiranjem ćuraka i brojlera može izazvati respiratorno oboljenje sa bar delimično istim karakteristikama koje se sreću u kliničkim slučajevima. Nakon inficiranja vazdušnih kesa izolatima *O. rhinotracheale* i kod ćuraka i kod brojlera je došlo do usporavanja rasta, bez makroskopskih promena na sekciji. Inficiranje ćuraka i brojlera različitog uzrasta, aerosolom, imalo je za posledicu usporen rast i razvoj patoanatomskih promena u traheji, vazdušnim kesama i plućima. Kod ćuraka je eksperimentalna infekcija (prouzrokovana aerosolom) pojačana prethodnom aplikacijom TRTV-a, a kod brojlera prethodnom aplikacijom NDV-a (slabiji efekat postignut je aplikacijom IBV-a i TRTV-a u odnosu na razvoj aerosakulitisa i pneumonije).

Najizraženiji klinički znak eksperimentalne infekcije bio je usporen rast. Međutim, drugi klinički znaci (slabost, dispnoja, mukozni iscedak iz nosa) i uginuća zapaženi kod prirodne infekcije nisu primećeni kod eksperimentalne infekcije. Ove razlike u eksperimentalnoj i prirodnoj infekciji mogle bi se objasniti razlikama u

predisponirajućim faktorima i uticajima drugih infektivnih agenasa. U terenskim uslovima značajan uticaj mogu da imaju: stres, prenaseljenost, loša ventilacija, prisustvo drugih bakterija i visok nivo amonijaka.

Najupečatljivija patoanatomska karakteristika eksperimentalne infekcije prouzrokovane ornitobakterijumom i NDV-om je fibrinozni aerosakulitis koji je ponekad bio udružen sa traheitisom i pneumonijom. Aerosakulitis se manifestovao nalazom penušavog eksudata sa krpicama fibrina u vazdušnim kesama.

Pneumonija je obično bila unilateralna sa jasnom granicom između zahvaćenih i nezahvaćenih delova pluća. Ove promene opisane su i u kliničkim slučajevima prirodne infekcije u kojima je izolovan *O. rhinotracheale*.

Iako se nisu ispoljili svi klinički znaci i patoanomske promene kao kod prirodne infekcije, ovim eksperimentom je potvrđeno da je *O. rhinotracheale* infektivni agens patogen za piliće i ćurke pošto su ispunjena sva tri Kohova postulata:

1. Agens je izolovan iz obolelih ali ne i iz zdravih jedinki;
2. Agens je izolovan u čistoj kulturi, kojom je prouzrokovano oboljenje kod ćuraka i brojlera posle eksperimentalnog inficiranja;
3. Agens je reizolovan iz obolelih jedinki.

#### **2.14.4. Eksperimentalna infekcija prepelica (*Coturnix coturnix japonica*)**

Eroksuz i saradnici (2006) ispitivali su patogenost uzročnika za japanske prepelice u eksperimentalnim uslovima. Inficirano je 30 mužjaka starih 10 nedelja putem aerosola *O. rhinotracheale* sojem B3263/91. Tokom šest nedelja, ptice u ogledu nisu ispoljavale kliničke simptome. Patoanatomski nalaz karakterisala je hiperemija traheje, hiperemija pluća i zadebljanje pleure. Histopatološkim ispitivanjem utvrđena je nekroza i deskvamacija trahealnog epitela, subepitelna krvarenja, subserozni edem i hiperemija pluća u trećoj i šestoj nedelji nakon inficiranja. Uočeno je i zadebljanje pleure kao posledica infiltracije mononuklearnim ćelijama.



## 2.15. Terapija

Teškoće u terapiji bolesti su posledica sposobnosti uzročnika za sticanje rezistencije na brojne antibiotike: enrofloksacin, linkomicin, tilozin, doksiciklin, sulfonamide i flumekvin (Devriese i saradnici, 1995; van Empel i Hafez, 1999).

Utvrđeno je da osetljivost ornitobakterijuma na antibiotike varira u zavisnosti od porekla soja. Tako je na primer u Nemačkoj 90% sojeva rezistentno na enrofloksacin (Hafez, 1996), dok su izolati iz Francuske i Belgije (gde se jaja uglavnom ne tretiraju antibioticima) gotovo uvek vrlo osetljivi na ovaj antibiotik (Devriese i saradnici, 1995; Dudouyt i saradnici, 1995; Roger i Léorat, 1997).

Lečenje obolelih ćuraka konvencionalnim, oralno primenjenim antibioticima davalo je slabe rezultate, naročito u slučajevima klinički izražene pneumonije. Upotreba enrofloksacina i trimetoprim-sulfametoksazola nije bila efikasna. U nekim slučajevima oboljenja, injekcijama tetraciklina ili sintetskih penicilina (uglavnom dvokratno aplikovanih) postignuti su dobri efekti. Neuspešna terapija imala je za posledicu visok mortalitet koji je iznosio i do 25% u par nedelja (van Beek, 1994). Gotovo svi sojevi izolovani u Holandiji bili su rezistentni na flumekvin, slabo osetljivi na enrofloksacin i trimetoprim-sulfametoksazol, a osetljivi na ampicilin i tetraciklin (van Empel i Hafez, 1999).

Istraživanja u Nemačkoj pokazala su da je 90-100% ispitanih sojeva *O. rhinotracheale* poreklom iz Nemačke rezistentno na enrofloksacin, neomicin, gentamicin i trimetoprim-sulfametoksazol, dok su svi ispitani sojevi osetljivi na tetraciklin, hloramfenikol i amoksicilin (Hafez, 1996).

Primenom tetraciklina, hloramfenikola i amoksicilina u vodi za piće postignuti su dobri rezultati u Nemačkoj i Velikoj Britaniji (Chin i Droual, 1997). Pri razmatranju ovih rezultata treba imati u vidu da pozitivni efekti postignuti primenom hloramfenikola nemaju praktičan značaj za živinarstvo zbog zakonske regulative u Republici Srbiji (zabrana korišćenja hloramfenikola kod životinja čiji se proizvodi koriste za ljudsku ishranu).

Svi ispitani sojevi u Francuskoj bili su osetljivi na amoksicilin, spektinomicin i tilozin, a rezistentni na gentamicin i kolistin (Roger i Léorat, 1997).

Nagaraja i saradnici (1998) izveštavaju o osetljivosti sojeva *O. rhinotracheale* u SAD-u. Svi testirani sojevi bili su osetljivi na ampicilin, eritromicin, penicilin, spektinomicin i tilozin. Pedeset četiri od 68 sojeva bila su osetljiva na neomicin, sarafloksacin i tetracikline, a manji broj je bio osetljiv na gentamicin, streptomycin i



trimetoprim. Poređenjem osetljivosti američkih i nemačkih izolata na antibiotike utvrđene su razlike, pogotovo u odnosu na eritromicin i sarafloksacin na koje su nemački izolati bili osetljivi u znatno manjem procentu (Nagaraja i saradnici, 1998).

Aplikacijom hlortetraciklina kroz vodu za piće u dozi od 500 ppm, tokom 4-5 dana i aplikacijom amoksicilina u dozi od 250 ppm tokom 3-7 dana postignuti su dobri terapijski efekti (Hafez, 1997).

Sojevi *O. rhinotracheale* su veoma osetljivi na različite hemijske dezinficijense. Preparati na bazi organskih kiselina (mravlja, oksal-sirćetna) ili aldehida, inaktiviraju *O. rhinotracheale* u koncentraciji od 0,5% za 15 minuta u uslovima *in vitro* (Hafez i Schulze, 1998).

Danas je poznato da infekcija *O. rhinotracheale* ima enzootski karakter i da može da se javi u svakom novouseljenom jat, iako su u objektu prethodno primenjene zoohigijenske mere (čišćenje i dezinfekcija), a naročito u područjima sa razvijenom živinarskom proizvodnjom i na farmama sa različitim starosnim kategorijama.

Neadekvatno sprovođenje zootehničkih mera pri pražnjenju objekata, može da ima za posledicu kontaminaciju susednih useljenih objekata i stalno održavanje infekcije na farmi (van Empel i Hafez, 1999).

## 2.16. Vakcinacija

Vakcinacija nije našla širu primenu u sprečavanju izbijanja i širenja infekcije prouzrokovane ornitobakterijumom. Na tržištu postoje inaktivisane vakcine proizvedene od *O. rhinotracheale*, serotipa A, namenjene za vakcinisanje kokoši brojlerskih majki u cilju zaštite podmlatka u prvim nedeljama života. Vakcinacija živim vakcinama bila bi rizična pošto atenuirani sojevi *O. rhinotracheale* mogu da ispolje patogeno dejstvo kod živine primarno inficirane virusima.

Kod pilića je najzastupljeniji *O. rhinotracheale*, serotip A, pa je zaštita vakcinama na bazi ovog serotipa dovoljna, dok je kod ćuraka neophodna zaštita protiv više serotipova. Vakcinacijom SPF leghorn pilića bakterinom u uljnom adjuvansu utvrđeno je da postoje unakrsne reakcije, ali ne između svih serotipova (van Empel i Hafez, 1999).

Objavljeni su rezultati brojnih istraživanja koji ukazuju na pozitivne efekte primene inaktivisanih vakcina kod brojlera, tovnih ćuraka, brojlerskih roditelja i roditeljskih ćuraka. Vakcinisanjem jednodnevnih ćurića i brojlera bakterinima u uljnom adjuvansu postignut je zadovoljavajući nivo zaštite od eksperimentalnog inficiranja

homolognim sojem. Posle vakcinacije jednodnevnih brojlera bakterinom u uljnom adjuvansu izostajala je pojava aerosakulitisa koja se ispoljavala u kontrolnoj grupi nevakcinisanih jedinki nakon eksperimentalnog inficiranja NDV-om, 19. dana i ornitobakterijumom 26. dana (van Empel i van den Bosch, 1998). Vakcinacijom jednodnevnih ćurića bakterinom u uljnom adjuvansu postignuti su rezultati u sprečavanju redukcije telesne mase, razvoja pneumonije i aerosakulitisa što su bile manifestacije u kontrolnoj grupi nevakcinisanih ćurića posle eksperimentalnog inficiranja ornitobakterijumom i TRTV-om (van Empel i Hafez, 1999). Međutim, poznato je da vakcinacija jednodnevnih ptica bakterinima u jačem uljnom adjuvansu može da ima negativne efekte na proizvodne rezultate. Eksperimentalna vakcinacija, primenom različitih adjuvanasa davala je različite rezultate, a neke vakcine aplikovane jednodnevnim pilićima nisu sprečavale razvoj aerosakulitisa (van Empel i van den Bosch, 1998).

Vakcinacija ćuraka u starosti od tri i sedam nedelja inaktivisanom vakcinom, imala je za posledicu znatno niži mortalitet (1,79-3,63%) u poređenju sa nevakcinisanim kontrolnim grupama (3,54-7,27%). Procenat škartova u vakcinisanoj grupi iznosio je svega 20% od broja u nevakcinisanoj kontrolnoj grupi (van Empel i Hafez, 1999).

Praćenjem jata tovnih ćuraka do devetnaeste nedelje starosti, vakcinisanih bakterinom u drugoj i šestoj nedelji, zabeleženi su dobri rezultati u preveniranju pneumonije i aerosakulitisa (van Empel i Hafez, 1999).

S obzirom da je prisustvo maternalnih antitela kod brojlera utvrđeno širom sveta i da postoji mogućnost prenošenja uzročnika preko jaja, vršena su ispitivanja uticaja vakcinacije brojlerskih roditelja na zaštitu podmlatka u prvim nedeljama života i sprečavanje širenja infekcije.

Van Empel i van den Bosch (1998) su utvrdili da kod podmlatka vakcinisanih brojlerskih roditelja izostaje razvoj pneumonije i aerosakulitisa nakon eksperimentalnog inficiranja NDV-om i ornitobakterijumom, za razliku od pilića nevakcinisanih roditelja (kontrolna grupa).

Vakcinisanjem brojlerskih roditelja u 9. i 18. nedelji monovalentnim bakterinom (dobijenim od serotipa A) u uljnom adjuvansu postignut je dobar humoralni odgovor, a proizvodni rezultati kod podmlatka bili su bolji u poređenju sa kontrolnim grupama pilića poreklom od nevakcinisanih roditelja (Bisschop i saradnici, 2004).

### 3. CILJ I ZADACI ISPITIVANJA

Ispitivanja u ovom radu imala su za cilj da se utvrdi uticaj *O. rhinotracheale* na razvoj patomorfoloških promena u respiratornim organima i zdravstveno stanje kokoši brojlerskih roditelja i fazana iz odgoja. Postavljeni cilj realizovan je kroz sledeće zadatke:

1. Opservacija i merenje telesne mase ptica posle veštačkog inficiranja.
2. Serološko ispitivanje krvi na prisustvo specifičnih antitela za *O. rhinotracheale* i druge uzročnike respiratornih infekcija.
3. Ispitivanje makroskopskih promena u organima veštački inficiranih ptica.
4. Mikroskopsko ispitivanje respiratornih organa ptica upotrebom standardnih histoloških metoda.
5. Reizolacija i identifikacija uzročnika iz organa veštački inficiranih ptica.
6. Obrada i poređenje rezultata oglednih grupa.

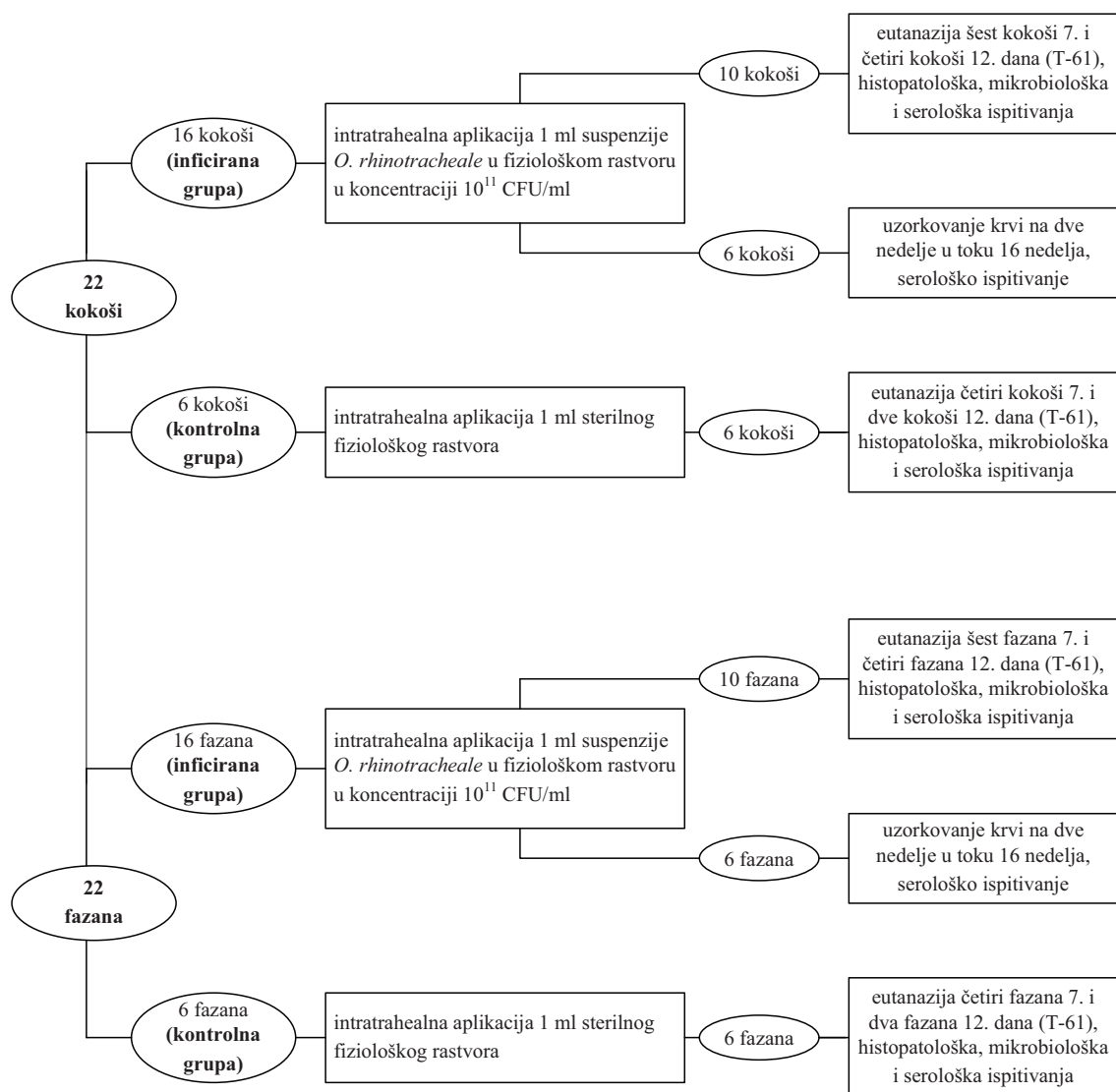
## 4. MATERIJAL I METODE ISPITIVANJA

### 4.1. Materijal

#### 4.1.1. Ptice u eksperimentu

Za eksperiment su korišćene kokoši brojlerski roditelji hibrida „Ross 308“ i fazani iz završne faze odgoja. Kokoši su tokom odgoja, vakcinisane po četiri puta protiv atipične kuge živine i infektivnog bronhitisa, kao i protiv drugih infektivnih bolesti prema uobičajenom programu vakcinacije za brojlerske roditelje u odgoju. Fazani su tokom odgoja vakcinisani dva puta protiv atipične kuge živine dok vakcinacija protiv drugih bolesti nije primenjivana. Iz jata brojlerskih roditelja i fazana iz kojih su odabrane ptice za eksperiment, uzorkovana je krv od po 50 ptica dva puta u razmaku od tri nedelje radi ispitivanja prisustva specifičnih antitela protiv *O. rhinotracheale*, kako bi se isključila mogućnost da su jata bila prirodno inficirana. Pošto su dobijeni negativni rezultati, za eksperiment je odabrano 22 kokoši brojlerskih roditelja, starosti 15 nedelja i 22 fazana starosti 19 nedelja. Ptice su podeljene u četiri grupe koje su držane u podnom sistemu, u odvojenim prostorijama. Hranjene su potpunim krmnim smešama kojima su hranjene pre uvođenja u ogled, sa izbalansiranim sadržajem hranljivih materija prilagođenom uzrasnim potrebama. Fazani su dobijali hranu i vodu *ad libitum*, a brojlerski roditelji su hranjeni obročno, jednom dnevno, dok im je voda bila stalno dostupna. Na dan uvođenja ptica u ogled, uzorkovana je krv radi serološkog pregleda na prisustvo specifičnih antitela za *O. rhinotracheale* i trahealni brisevi za bakteriološki pregled, kako bi se isključila mogućnost da su ptice bile prirodno inficirane. Nakon sedmodnevne aklimatizacije, inficirana je po jedna grupa od 16 fazana i 16 brojlerskih roditelja, a po jedna grupa od 6 fazana i 6 brojlerskih roditelja služile su kao kontrole.

Sedmog dana posle inficiranja, eutanazirano je po 6 ptica iz inficiranih grupa i po 4 ptice iz kontrolnih grupa intravenskom aplikacijom preparata „T61“, proizvođača Intervet. Dvanaestog dana od inficiranja eutanazirane su po 4 ptice iz inficiranih i po 2 ptice iz kontrolnih grupa. Preostale inficirane ptice, 6 brojlerskih roditelja i 6 fazana, držane su u ogledu 16 nedelja posle inficiranja radi ispitivanja serološkog odgovora na *O. rhinotracheale* (shema 3).



**Shema 3. Plan eksperimenta**

#### **4.1.2. Bakterijski soj**

Za eksperimentalnu infekciju je korišćen soj *O. rhinotracheale* B3263/91, serotip A, koji je jedan od prvih izolata ove bakterije u svetu. Izolovan je iz organa brojlera koji su ispoljavali respiratorne simptome na jednoj farmi u južnoj Africi, 1991. godine, kao do tada nepoznat mikroorganizam jer se nije mogao identifikovati upotrebom poznatih metoda.

#### **4.1.3. Priprema bakterijske kulture za eksperimentalnu infekciju**

Bakterijski soj je kultivisan na Kolumbija (Columbia) agaru, gotovoj hranljivoj podlozi koja sadrži 10% ovčije krvi, proizvođača „bioMérieux“, Francuska, pod mikroaerofilnim uslovima. Nakon inkubacije u trajanju od 48 h, pikirane su kolonije i suspendovane u sterilnom fiziološkom rastvoru. Od 10 ml polazne suspenzije, napravljena su decimalna razređenja od  $10^{-1}$  do  $10^{-12}$  iz kojih su sa po 0,1 ml zasejavane dve ploče Kolumbija krvnog agara. Posle inkubacije u trajanju od 24 h na temperaturi od 37° C, pod mikroaerofilnim uslovima, brojane su izrasle bakterijske kolonije. Množenjem sa odgovarajućim faktorom razređenja početne suspenzije utvrđeno je da se u razređenju  $10^{-1}$  nalazi  $5 \times 10^{11}$  CFU/ml, te je ovo razređenje odabrano za izazivanje veštačke infekcije.

#### **4.1.4. Inokulacija bakterijske kulture**

Ptice su inficirane intratrahealno, pomoću sistema za intravensku aplikaciju. Na plastičnu brizgalicu od 3 ml stavljen je sistem za intravensku aplikaciju, odsečen je i odbačen veći deo gumene cevčice do igle, a preostali deo cevčice u dužini od 5 cm korišćen je za uvođenje u traheju i aplikaciju bakterijske suspenzije. Grupi fazana i grupi brojlerskih roditelja aplikovan je intratrahealno po 1 ml suspenzije bakterijske kulture u sterilnom fiziološkom rastvoru, a preostalim dvema grupama koje služile kao kontrolne grupe, aplikovan je intratrahealno po 1 ml sterilnog fiziološkog rastvora.

#### **4.1.5. Opservacija**

Nakon inficiranja, ptice su svakodnevno, dva puta opservirane, a telesna masa merena im je na dan uvođenja u ogled i sedam dana posle inficiranja.

#### 4.1.6. Uzorkovanje

Za serološko ispitivanje uzimano je po 50 uzoraka krvi iz jata iz kojih su odabrane ptice za ogled, dva puta u razmaku od tri nedelje, a od svih oglednih ptica uzorkovana je krv na dan uvođenja ptica u ogled. Pticama koje su žrtvovane uzorkovana je krv prilikom eutanazije, sedmog i dvanaestog dana posle inficiranja. Dvanaestog dana uzorkovana je i krv od po još dve ptice iz inficiranih grupa koje su ostale u ogledu radi praćenja serološkog odgovora. Od preostalih ptica iz inficiranih grupa, 6 fazana i 6 kokoši brojlerskih roditelja, uzorkovana je krv na svake dve nedelje od 28. do 112. dana od inficiranja.

Leševi eutanaziranih ptica su obdukovani, a brisevi vazdušnih kesa i organi: nosne šupljine, infraorbitalni sinusi, larinks, traheja, pluća, srce, slezina, jetra i bubrezi uzorkovani su za bakteriološko ispitivanje. Za histopatološko ispitivanje uzorkovani su respiratorni organi: nosne šupljine, infraorbitalni sinusi, larinks, traheja, pluća i vazdušne kese.

### 4.2. Metode

#### 4.2.1. Serološko ispitivanje

Svi uzorci krvi su ispitani serološki na prisustvo specifičnih antitela za *O. rhinotracheale*, metodom ELISA, prema uputstvu proizvođača dijagnostikuma. Uzorci krvi svih ptica koji su uzorkovani na dan uvođenja ptica u ogled i uzorci krvi ptica koji su uzorkovani prilikom žrtvovanja sedmog i dvanaestog dana ispitani su serološki, metodom ELISA, i na prisustvo specifičnih antitela za virus atipične kuge živine, virus infektivnog bronhitisa, pneumovirus, virus avijarne influence, kao i dve mikoplazme *M. gallisepticum* i *M. synoviae*.

Za ispitivanje prisustva specifičnih antitela za *O. rhinotracheale* je korišćen dijagnostikum „Flock Chek ORT“, proizvođača „IDEXX“ koji je dizajniran po principu metoda indirektna ELISA. Ispitivani krvni serum, razređeni 500 puta, nanošeni su u odgovarajuća udubljena mikrotitracione ploče za koja je vezan bakterijski antigen. Tokom inkubacije od 30 minuta na sobnoj temperaturi, ukoliko su bila prisutna, antitela iz seruma vezala su se za antigene u mikrotitracionoj ploči. Mikrotitracione ploče su ispirane destilovanom vodom, dodavan je konjugat, ponovo su inkubirane na sobnoj temperaturi tokom 30 minuta, ispirane, a zatim je dodavan supstrat i nakon 15 minuta „stop rastvor“ za zaustavljanje reakcije. Kod pozitivnih uzoraka seruma, za antigen-

antitelo komplekse formirane u ploči, nakon dodavanja konjugata vezala su se i anti-antitela obeležena enzimom. Kada je dodat supstrat došlo je do razvoja bojene reakcije što je posledica razlaganja supstrata enzimom. Po nanošenju uzoraka krvnih seruma u kojima nije bilo specifičnih antitela, izostalo je formiranje antigen-antitelo kompleksa u ploči, nevezana antitela obeležena enzimom (konjugat) su isprana pa je nakon dodavanja supstrata izostala pojava boje.

Reakcija je očitavana ELISA čitačem, spektrofotometarskim aparatom tipa „Multiskan RC“ proizvođača Labsystems, na talasnoj dužini od 650 nm. Iz dobijenih vrednosti optičkih gustina vršeni su dalji proračuni i interpretirani rezultati. Rezultati se tumače na osnovu izračunate S/P vrednosti (odnos optičke gustine uzorka i pozitivne kontrole) i vrednosti titra prema formulama:

$$\frac{S}{P} = \frac{OD_{uzorka} - \overline{OD_{neg}}}{\overline{OD_{pos}} - \overline{OD_{neg}}}; \text{Log}_{10}\text{titar} = 1,09(\log_{10}S/P)+3,36$$

Prema uputstvu proizvođača dijagnostikuma, rezultati se procenjuju na osnovu vrednosti titra antitela. Ukoliko su vrednosti titra antitela veće od 844 uzorci se smatraju pozitivnim.

Za ispitivanje prisustva specifičnih antitela protiv virusa atipične kuge živine, virusa infektivnog bronhitisa, pneumovirusa, virusa avijarne influence, *M. gallisepticum* i *M. synoviae* u krvnom serumu, korišćeni su dijagnostikumi proizvođača IDEXX koji su dizajnirani po principu metoda indirektna ELISA. Način izvođenja je identičan opisanom postupku za utvrđivanje prisustva specifičnih antitela za *O. rhinotracheale*. Rezultati za sve navedene testove se interpretiraju na osnovu vrednosti titra specifičnih antitela, osim kod testa za utvrđivanje specifičnih antitela za virus avijarne influence kod kojeg se rezultati interpretiraju na osnovu S/P vrednosti. Ukoliko je titar specifičnih antitela za *M. gallisepticum* i *M. synoviae* veći od 1076, a za virus atipične kuge živine, virus infektivnog bronhitisa i pneumovirus veći od 396 uzorci se proglašavaju pozitivnim. Specifična antitela za virus avijarne influence u krvnom serumu su prisutna ukoliko je S/P vrednost veća od 0,50.

#### **4.2.2. Bakteriološko ispitivanje**

Uzorci organa: nosnih šupljina, infraorbitalnih sinusa, larinksa, traheje, pluća, srca, slezine, jetre, bubrega i brisevi vazdušnih kesa ispitani su bakteriološki. Za primarnu izolaciju uzročnika iz organa korišćen je Kolumbija krvni agar proizvođača „bioMérieux“, Francuska i selektivna hranljiva podloga sa gentamicinom koja je



pripremana po standardnoj proceduri u laboratoriji Veterinarskog specijalističkog instituta „Pančevo“. U bazu za krvni agar, proizvođača Torlak, dodavano je 10% sveže ovčije krvi i gentamicin u količini od 10 µg/ml hranljive podloge. Bakterije koje su na ovim podlogama formirale male, cirkularne, sive do sivo-bele kolonije, prečnika oko jedan ili više milimetara označavane su kao sumnjive. One su zasejavane na „MacConkey“ agar i na Kliglerov agar sa trostrukim šećerom i gvožđem gde nije bilo rasta, odnosno reakcije u vidu promene boje podloge i formiranja gasa. Od sumnjivih kolonija pravljeni su i mikroskopski preparati koji su bojeni po Gramu, a zatim su se od kolonija gram-negativnih pleomorfni bacila izvodili biohemijski testovi oksidaze i katalaze i konvencionalni biohemijski testovi: reakcija sa metil crvenim (Voges-Proskauer reakcija), dokazivanje stvaranja indola i ONPG test. Gram negativni pleomorfni bacili koji su davali pozitivnu reakciju u oksidaza testu, a negativnu u katalaza testu identifikovani su upotrebom komercijalnog test kita za biohemijsku identifikaciju „API 20 NE“ proizvođača „bioMérieux“, Francuska. Ovaj komercijalni sistem za biohemijsku identifikaciju zasniva se na ispitivanju većeg broja biohemijskih i fizioloških osobina mikroorganizama. Sastoji se iz 8 konvencionalnih testova i 12 asimilacionih testova koji se izvode u udubljenjima sa kupolom, postavljenim na bliskom odstojanju na tankoj plastičnoj traci, u kojima se nalaze dehidrirani supstrati. Od 2-4 sumnjive kolonije pravljen je suspenzija u 5 ml sterilnog fiziološkog rastvora. Pomoću automatske mikropipete nanošeno je po 100 µl suspenzije u udubljenja sa oznakom testa od NO<sub>3</sub> do PNPG, a zatim su dopunjena sa po 200 µl sterilnog fiziološkog rastvora kako bi se ispunile i kupole. Udubljenja i kupole sa oznakom testa GLU do PAC su ispunjene u potpunosti bakterijskom suspenzijom. U udubljenja 3 testa GLU, ADH i URE dodato je mineralno ulje do formiranja koveksnog meniskusa u kupoli. Radi sprečavanja isparavanja vode, u plastičnu kutiju za inkubiranje dodato je malo sterilne destilovane vode i sistem je inkubiran tokom 24 h na 37° C pod mikroaerofilnim uslovima. Rezultati su očitavani praćenjem tabele za očitavanje. Najpre su očitane spontane reakcije konvencionalnih biohemijskih testova (GLU, ADH, URE, ESC, GEL i PNPG) i zabeležene u odgovarajući obrazac. Zatim su, sledeći uputstvo proizvođača, dodavani reagensi NIT1 i NIT2, a posle 5 minuta Zn, u kupolu sa oznakom testa NO<sub>3</sub> i reagens JAMES u kupolu sa oznakom testa TRP, tako da su očitana i preostala dva konvencionalna biohemijska testa. Konačno, očitavanjem asimilacionih testova upisane su u obrazac vrednosti svih reakcija na osnovu kojih je dobijena šifra za sumnjivi izolat po kojoj je on identifikovan. Iako uzročnik nije unet u

bazu podataka mikroorganizama, korišćeni su podaci iz literature prema kojima *O. rhinotracheale* daje šifru 0020004 ili 0220004 u ovom sistemu.

#### **4.2.3. Histopatološko ispitivanje**

Za histopatološko ispitivanje uzorkovani su tkivni isecci nosne šupljine, infraorbitalnih sinusa, larinksa, traheje, pluća, vazdušnih kesica i fiksirani u 10% puferizovanom formalinu u trajanju od 48 do 72 h. Nakon toga tkivo je obrađeno u automatskom tkivnom procesoru: dehidracijom kroz seriju alkohola, prosvetljavanjem u ksilolu, impregnacijom parafinom i uklopljeno u parafinske blokove. Parafinski isecci debljine oko 5  $\mu$ m obojeni su standardnom hematoksilin-eozin metodom (HE).

#### **4.2.4. Statistička obrada podataka**

U statističkoj analizi dobijenih rezultata korišćeni su deskriptivni statistički parametri: aritmetička sredina ( $\bar{X}$ ), standardna devijacija (SD), standardna greška (Sx), minimalna vrednost ( $X_{\min}$ ), maksimalna vrednost ( $X_{\max}$ ) i koeficijent varijacije (CV). Prilikom testiranja i utvrđivanja statistički značajnih razlika između ispitivanih eksperimentalnih grupa korišćen je Studentov t test, pomoću kojeg su ustanovljavane statistički signifikantne razlike između tretmana pojedinačno. Signifikantnost razlika ustanovljavana je na nivoima značajnosti od 5% i 1%. Svi dobijeni rezultati prikazani su tabelarno.

## 5. REZULTATI

### 5.1. Rezultati praćenja zdravstvenog stanja

#### 5.1.1. Klinička slika kod kokoši brojlerskih roditelja

Tokom trajanja oglada ptice su dva puta dnevno opservirane, a neposredno pre i sedam dana posle inficiranja, merena im je i telesna masa. Kod kokoši brojlerskih roditelja iz inficirane i kontrolne grupe nisu zapaženi klinički simptomi bolesti. Na perju, koži i vidljivim sluznicama nisu utvrđene vidljive promene. Apetit je tokom celog trajanja oglada bio dobar. Prilikom hranjenja sve ptice su se grupisale oko hranilica i ravnomerno uzimale hranu. Dnevni obrok pojele su za oko 5 minuta. Feces je bio uobičajeno formiran. Sedmodnevni prirast iznosio je 127 g kod ptica iz inficirane grupe (tabela 4) i 125 g kod ptica iz kontrolne grupe (tabela 5). Odstupanja telesne mase kod inficiranih brojlerskih roditelja u odnosu na kontrolnu neinficiranu grupu nisu bila statistički značajna ni pre, ni sedam dana posle inficiranja (tabela 6).

**Tabela 4. Rezultati merenja telesne mase inficiranih kokoši**

N	Pre inficiranja	Sedam dana posle inficiranja
1	1591	1711
2	1597	1719
3	1617	1740
4	1623	1747
5	1629	1751
6	1631	1755
7	1640	1770
8	1645	1771
9	1649	1778
10	1657	1788
11	1659	1789
12	1700	1830
13	1707	1835
14	1711	1841
15	1719	1850
16	1730	1863
$X_{min}$	1591	1711
$X_{max}$	1730	1863
$\bar{X}$	1657	1784
SD	44,05	47,46
Sx	11,01	11,87
CV	2,66%	2,66%

**Tabela 5. Rezultati merenja telesne mase kokoši iz kontrolne grupe**

N	Pre inficiranja	Sedam dana posle inficiranja
1	1599	1725
2	1641	1764
3	1657	1781
4	1663	1780
5	1697	1829
6	1721	1851
$X_{\min}$	1599	1725
$X_{\max}$	1721	1851
$\bar{X}$	1663	1788
SD	42,75	45,40
Sx	17,45	18,54
CV	2,57%	2,54%

**Tabela 6. Poređenje telesne mase kokoši iz inficirane i kontrolne grupe pre inficiranja i 7 dana posle inficiranja, primenom t testa**

	Pre inficiranja		Posle inficiranja	
	Kontrolna grupa	Inficirana grupa	Kontrolna grupa	Inficirana grupa
N	6	16	6	16
$X_{\min}$	1599	1591	1725	1711
$X_{\max}$	1721	1730	1851	1863
$\bar{X}$	1663	1657	1788	1784
SD	42,75	44,05	45,40	47,46
Sx	17,45	11,01	18,54	11,87
CV	2,57%	2,66%	2,54%	2,66%
$\Sigma$	9978	26505	10730	28538
t	t = 0,31 <sup>NZ</sup>		t = 0,21 <sup>NZ</sup>	

### 5.1.2. Klinička slika kod fazana

Drugog dana od inficiranja kod jednog fazana iz inficirane grupe zapaženo je sporije kretanje, neveselost, nakostrešenost perja i pokreti glave kao da pokušava da izbací sadržaj iz kljuna, slika 1. Kod dva fazana, sedam dana posle inficiranja, pritiskom na nosne otvore isticala je mala količina mutne sluzi, dok na sluznici usne duplje i konjunktivama nije bilo vidljivih promena. Na perju i koži nisu zapažene vidljive promene. Feces je bio uobičajeno formiran. Konzumiranje hrane u inficiranoj grupi je bilo smanjeno u odnosu na kontrolnu grupu što se vidi iz rezultata merenja telesne mase (tabela 7 i 8). Primenom Studentovog t testa utvrđeno je da postoji statistička značajnost ( $p < 0,05$ ) razlike u telesnoj masi izmerenoj sedam dana nakon inficiranja između fazana iz inficirane i kontrolne grupe. Razlika u telesnoj masi izmerenoj pre inficiranja između fazana iz inficirane i kontrolne grupe nije bila statistički značajna (tabela 9).



**Slika 1.** Kod fazana sa leve strane zapaža se usiljeno držanje tela i nakostrešenost perja

**Tabela 7. Rezultati merenja telesne mase inficiranih fazana**

N	Pre inficiranja	Sedam dana posle inficiranja
1	1194	1169
2	1198	1163
3	1213	1171
4	1218	1179
5	1227	1190
6	1235	1200
7	1243	1199
8	1251	1190
9	1255	1220
10	1261	1200
11	1265	1245
12	1275	1251
13	1280	1230
14	1287	1241
15	1290	1261
16	1299	1269
$X_{min}$	1194	1163
$X_{max}$	1299	1269
$\bar{X}$	1249	1211
SD	32,96	34,57
Sx	8,241	8,641
CV	2,64%	2,85%

**Tabela 8. Rezultati merenja telesne mase fazana iz kontrolne grupe**

N	Pre inficiranja	Sedam dana posle inficiranja
1	1199	1210
2	1201	1214
3	1253	1263
4	1261	1275
5	1267	1275
6	1279	1289
$X_{\min}$	1199	1210
$X_{\max}$	1279	1289
$\bar{X}$	1243	1254
SD	34,63	33,83
Sx	14,14	13,81
CV	2,79%	2,70%

**Tabela 9. Poređenje telesne mase fazana iz inficirane i kontrolne grupe pre inficiranja i 7 dana posle inficiranja, primenom t testa**

	Pre inficiranja		Posle inficiranja	
	Kontrolna grupa	Inficirana grupa	Kontrolna grupa	Inficirana grupa
N	6	16	6	16
$X_{\min}$	1199	1194	1210	1163
$X_{\max}$	1279	1299	1289	1269
$\bar{X}$	1243	1249	1254	1211
SD	34,63	32,96	33,83	34,57
Sx	14,14	8,241	13,81	8,641
CV	2,79%	2,64%	2,70%	2,85%
$\Sigma$	7460	19991	7526	19378
t	$t = 0,38^{NZ}$		$t = 2,63^*; p < 0,05$	

\* statistički značajna razlika

## 5.2. Rezultati patomorfološkog ispitivanja

### 5.2.1. Patomorfološke promene kod brojlerskih roditelja iz inficirane grupe

#### 5.2.1.1. Makroskopski nalaz

Kod većine kokoši brojlerskih roditelja iz inficirane grupe nisu nađene vidljive patoanatomske promene na unutrašnjim organima. Promene su otkrivene kod samo dve ptice, a bile su zastupljene u nosnim šupljinama, infraorbitalnim sinusima, larinksu, traheji i plućima. U nosnim šupljinama je zapažena hiperemija sluznice i nakupljanje sluzi, a u infraorbitalnim sinusima samo nakupljanje sluzi (slika 2).



**Slika 2.** Nosne šupljine i sinusi kokoši brojlerskog roditelja 7 dana nakon veštačkog inficiranja. Na poprečnom preseku nosnih šupljina i infraorbitalnih sinusa zapaža se hiperemija nosne sluznice i sluz u levoj nosnoj šupljini i infraorbitalnom sinusu.

Sluznica larinksa i traheje kod većine inficiranih brojlerskih roditelja bila je bledo-ružičasta, glatka i sjajna (slika 3). Kod dve kokoši sluznica larinksa i traheje bila je zacrvenjena, a u lumenu se nalazila mala količina sluzi (slika 4).





**Slika 3.** Traheja kokoši brojlerskog roditelja 7 dana posle veštačkog inficiranja. Bledo-ružičasta, glatka i sjajna sluznica.



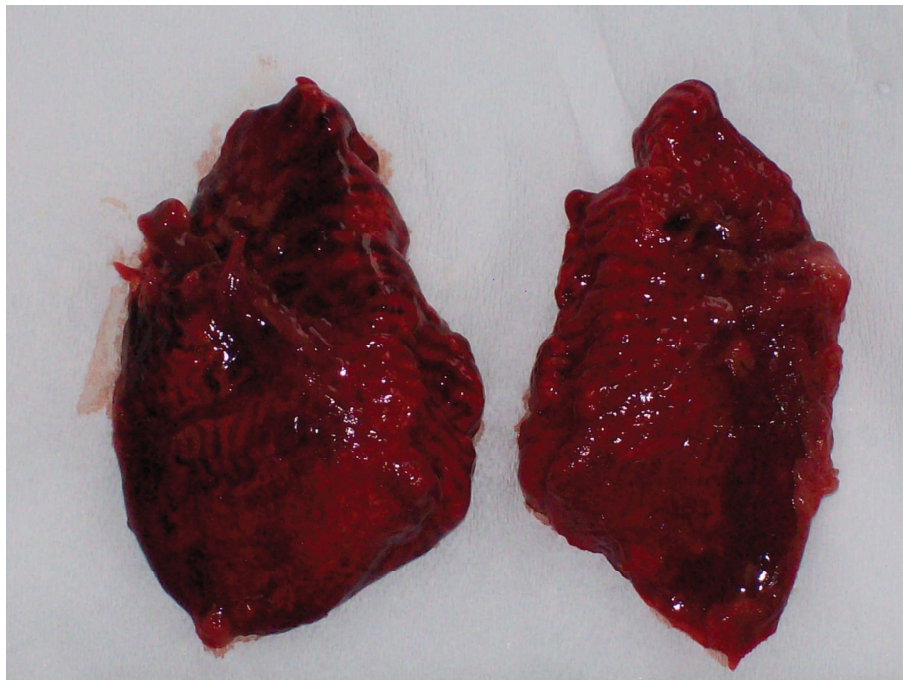
**Slika 4.** Larinks i traheja kokoši brojlerskog roditelja 7 dana posle veštačkog inficiranja. Zacrvenjena sluznica larinksa i traheje (*Laryngotracheitis catarrhalis*).

Kod jedne kokoši, pluća su bila uvećana, tamno-crvene boje, zaobljenih rubova, čvrste konzistencije. Na preseku promenjenih pluća isticala je krvavo-penušava tečnost

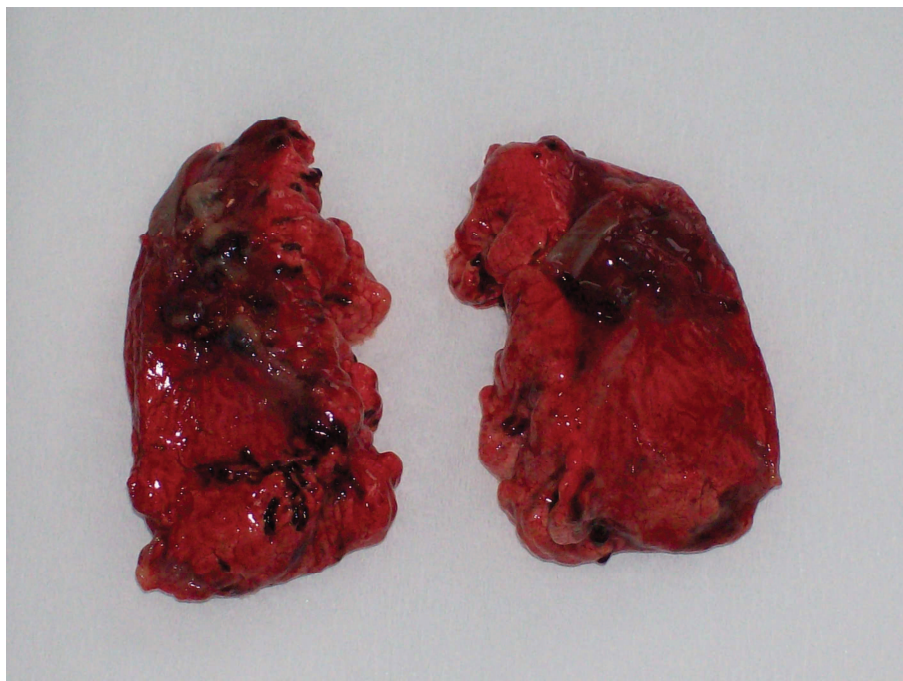


što je karakterističan nalaz za hiperemiju i edem pluća (slika 5). Kod jednog leša zapažena su ograničena krvarenja u oba plućna krila (slika 6).

U vazдушnim kesama makroskopskim pregledom nije utvrđeno prisustvo sadržaja, a zidovi vazdušnih kesa su bili glatki, vlažni, sjajni i prozirni.



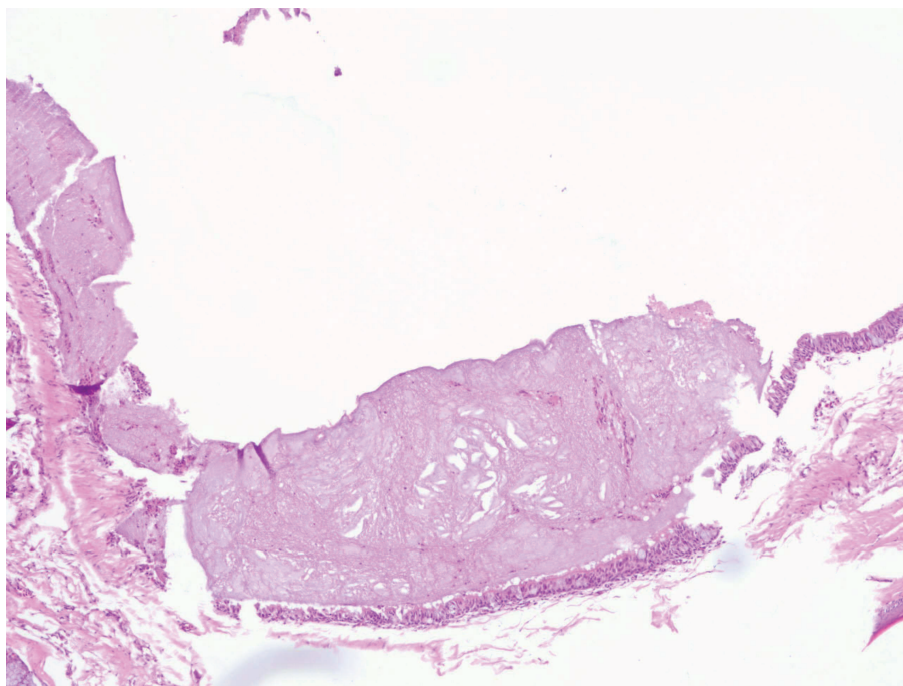
**Slika 5.** Pluća kokoši brojlerskog roditelja 7 dana nakon veštačkog inficiranja. Pluća su uvećana, crvene boje, čvrste konzistencije (*Hyperaemia et oedema pulmonis*).



**Slika 6.** Pluća kokoši 7 dana posle veštačkog inficiranja. Ograničena područja tamno crvene boje (*Haemorrhagiae pulmonis*).

#### 5.2.1.2. Mikroskopski nalaz

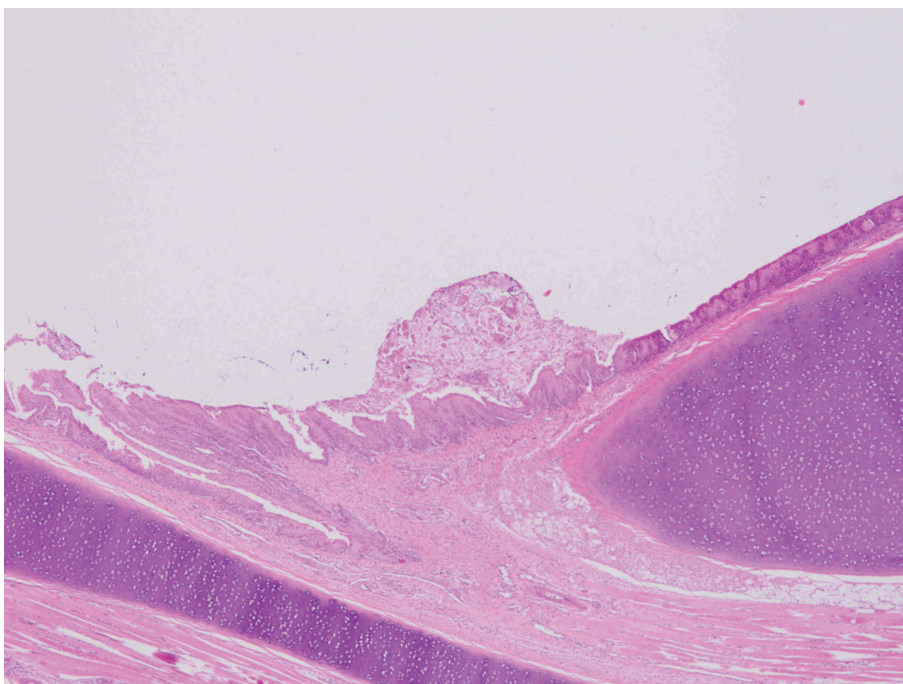
Histopatološke promene kod inficiranih kokoši brojerskih roditelja ustanovljene su u nosnim šupljinama, infraorbitalnim sinusima, larinksu, traheji, plućima i vazдушnim kesama. U jednom uzorku utvrđena je hiperemija nosne sluznice i povećano nakupljanje sluzi u nosnim šupljinama i infraorbitalnim sinusima (slika 7).



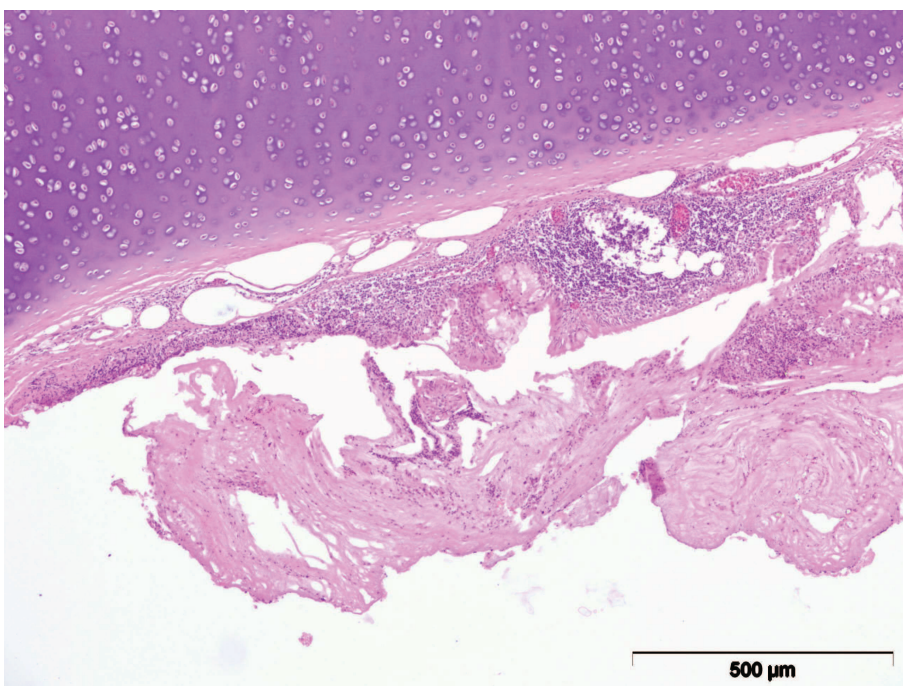
**Slika 7.** Infraorbitalni sinus kokoši brojerskog roditelja 7 dana posle veštačkog inficiranja. Nakupljanje sluzi (HE, obj. 20x).

U lumenu larinksa kod dve kokoši bio je prisutan sluzav sadržaj sa malim brojem deskvamisanih epitelних ćelija, eritrocita i heterofila (slika 8). Nalaz u lamini propriji karakterisalo je prisustvo ćelijskog infiltrata koji se sastojao iz heterofila i limfocita, kao i injiciranost krvnih sudova (slika 9).



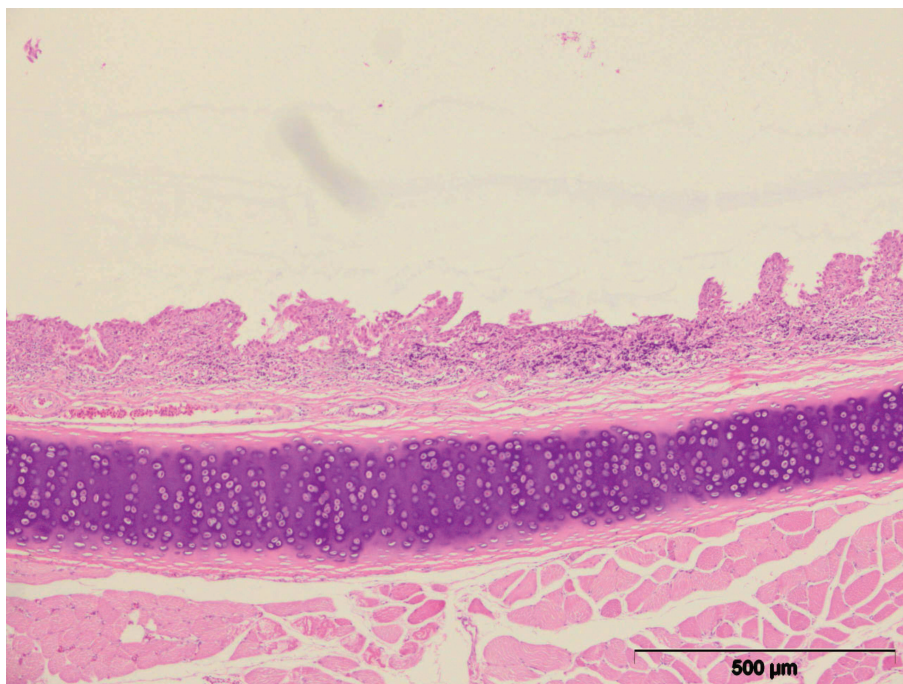


**Slika 8.** Larinks kokoši brojlerskog roditelja 7 dana posle veštačkog inficiranja. U lumenu se nalazi sluzav sadržaj sa heterofilima i eritrocitima (obj. 20x, HE).



**Slika 9.** Larinks kokoši brojlerskog roditelja 7 dana posle veštačkog inficiranja. U lumenu se nalazi sluzav sadržaj sa heterofilima i eritrocitima. U lamini propriji vidi se injiciranost krvnih sudova i ćelijski infiltrat u kojem dominiraju limfociti (HE).

Slično larinksu, u lumenu traheje kod nekoliko kokoši bio je prisutan sluzav sadržaj sa deskvamisanim epitelnim ćelijama, eritrocitima i heterofilima. Kod dve kokoši zapažena je hiperplazija epitela (slika 10) kao i fokalne degenerativno-nekrotične promene epitelnih ćelija. Nalaz u lamini propriji karakterisala je injiciranost krvnih sudova i ćelijski infiltrat u kojem su se nalazili heterofili, limfociti, monociti i po neka plazma ćelija (slika 11).



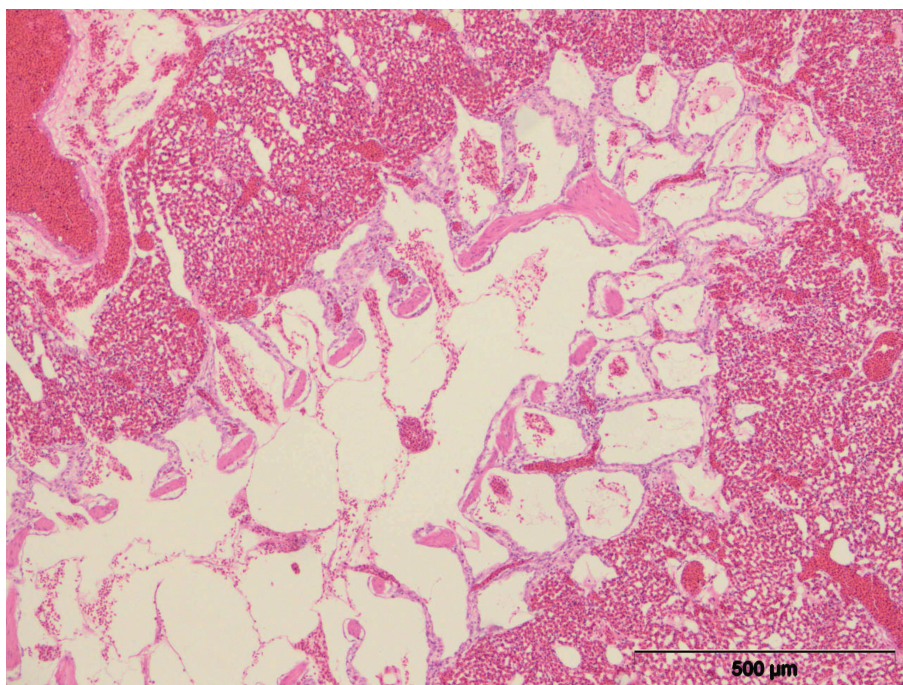
**Slika 10** Traheja kokoši brojlerskog roditelja 7 dana posle veštačkog inficiranja. Proliferacija epitela i limfocitni infiltrat u lamini propriji (HE).





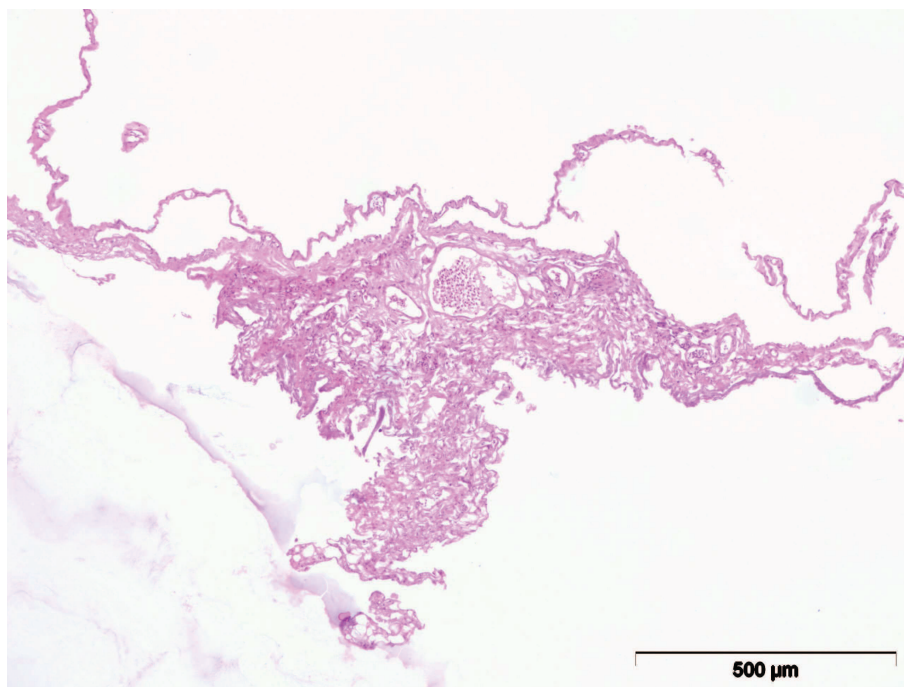
**Slika 11.** Traheja kokoši brojlerskog roditelja 7 dana posle veštačkog inficiranja. Akumulacija limfocita u lamini proprij (HE).

Nalaz u plućima tri kokoši bila je hiperemija, u jednim plućima hiperemija i edem i u jednim hemoragije (slika 12).

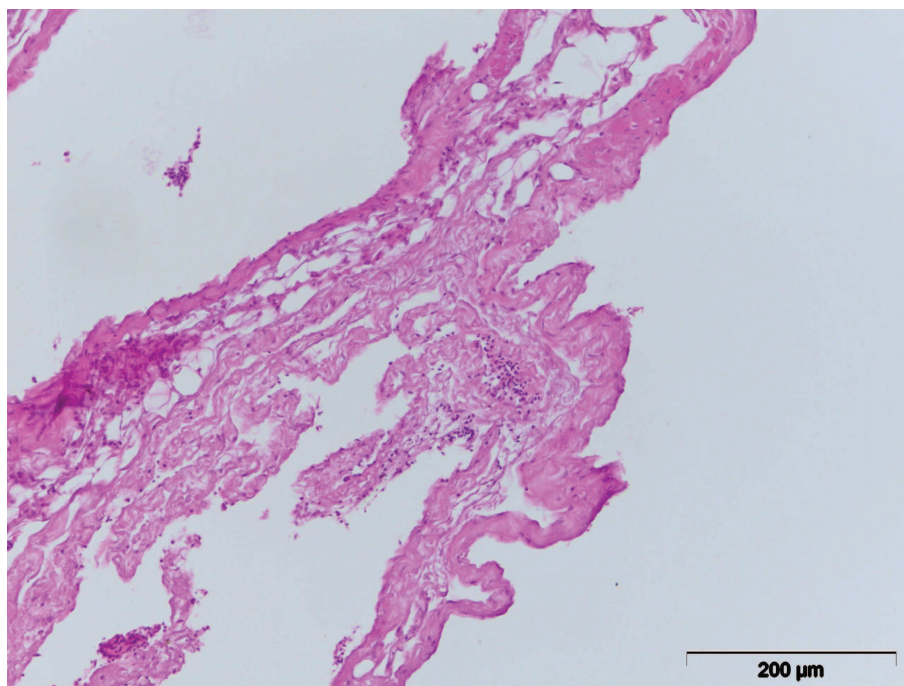


**Slika 12.** Pluća kokoši brojlerskog roditelja 7 dana posle veštačkog inficiranja. U parabronhijama i atrijsama nalaze se eritrociti (HE).

Vazdušne kese kod dva leša bile su zadebljale usled infiltracije zida mononuklearima (slika 13). Na epitelu su se mogle videti degenerativno-nekrotične promene, deskvamacija i fokalna hiperplazija (slika 14).



**Slika 13.** Abdominalna vazdušna kesa kokoši brojlerskog roditelja 7 dana posle veštačkog inficiranja. Mononuklearni ćelijski infiltrat u zidu vazdušne kese (HE).



**Slika 14.** Abdominalna vazdušna kesa kokoši brojlerskog roditelja 7 dana posle veštačkog inficiranja. Degenerativno-nekrotične promene epitelnih ćelija i subepitelni limfocitni infiltrat (HE).

Histopatološke promene u respiratornim organima inficiranih kokoši brojlerskih roditelja utvrđene su kod 5 ptica (tabela 10). Učestalost histopatoloških promena iznosila je 10-40% za pojedine organe. Rezultati su prikazani u tabelama 11-16.

**Tabela 10. Zastupljenost histopatoloških promena u respiratornim organima inficiranih kokoši**

kokoši	nosne šupljine	sinusi	larinks	traheja	pluća	vazdušne kese
1	+	+	-	-	+	-
2	-	-	+	+	+	+
3	-	-	-	+	+	+
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	+	+	+	-
6	-	-	-	+	+	-
7	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
ukupno	1	1	2	4	5	2
%	10	10	20	40	50	20

**Tabela 11. Učestalost ustanovljenih histopatoloških promena u nosnim šuplinama kokoši brojlerskih roditelja inficiranih *O. rhinotracheale***

Tip promene	Učestalost promene (%)
Hiperemija	1/10 (10)
Eksudat u lumenu	1/10 (10)

**Tabela 12. Učestalost ustanovljenih histopatoloških promena u infraorbitalnim sinusima kokoši brojlerskih roditelja inficiranih *O. rhinotracheale***

Tip promene	Učestalost promene (%)
Eksudat	1/10 (10)

**Tabela 13. Učestalost ustanovljenih histopatoloških promena u larinksu kokoši brojlerskih roditelja inficiranih *O. rhinotracheale***

Tip promene	Učestalost promene (%)
Hiperemija	2/10 (20)
Hiperplazija epitela	1/10 (10)
Degenerativno-nekrotične promene epitelnih ćelija	1/10 (10)
Deskvamacija epitela	1/10 (10)
Čelijski infiltrat u lamini propriji	2/10 (20)
Eksudat u lumenu	2/10 (20)

**Tabela 14. Učestalost ustanovljenih histopatoloških promena u traheji kokoši brojlerskih roditelja inficiranih *O. rhinotracheale***

Tip promene	Učestalost promene (%)
Hiperemija	3/10 (30)
Hiperplazija epitela	2/10 (20)
Degenerativno-nekrotične promene epitelnih ćelija	2/10 (20)
Deskvamacija epitela	3/10 (30)
Čelijski infiltrat u lamini propriji	3/10 (30)
Eksudat u lumenu	4/10 (40)

**Tabela 15. Učestalost ustanovljenih histopatoloških promena u plućima kokoši brojlerskih roditelja inficiranih *O. rhinotracheale***

Tip promene	Učestalost promene (%)
Hiperemija	4/10 (40)
Edem	1/10 (10)
Krvarenja	1/10 (10)

**Tabela 16. Učestalost ustanovljenih histopatoloških promena u vazдушnim kesama kokoši brojlerskih roditelja inficiranih *O. rhinotracheale***

Tip promene	Učestalost promene (%)
Čelijski infiltrat	2/10 (20)
Degenerativno-nekrotične promene epitelnih ćelija	1/10 (10)



### 5.2.2. Patomorfološke promene kod brojerskih roditelja iz kontrolne grupe

Kod brojerskih roditelja iz kontrolne grupe nije bilo vidljivih makroskopskih promena, osim umerene hiperemije pluća kod pojedinih leševa. U nosnim šupljinama nije bilo sadržaja ili se nalazila mala količina sluzi dok u infraorbitalnim sinusima nije bilo sadržaja. Sluznica larinksa i traheje je bila bledo-ružičasta, glatka, vlažna i sjajna (slika 15).

Mikroskopskim pregledom isečaka tkiva respiratornih organa utvrđena je injiciranost krvnih sudova pluća četiri kokoši dok u ostalim pregledanim organima nisu utvrđene histopatološke promene.



**Slika 15.** Izgled traheje kod kokoši iz kontrolne grupe (levo) i inficirane grupe (desno), 7 dana posle veštačkog inficiranja.

### 5.2.3. Patomorfološke promene kod fazana iz inficirane grupe

#### 5.2.3.1. Makroskopski nalaz

Patoanatomske promene kod inficiranih fazana utvrđene su u nosnim šupljinama, infraorbitalnim sinusima, larinksu, traheji, plućima i vazdušnim kesama. Promene su nađene kod sedam ptica. Kod nekoliko fazana nosna sluznica je bila zacrvenjena, a u nosnim šupljinama i infraorbitalnim sinusima nalazila se sluz (slika 16).



**Slika 16.** Nosne šupljine i infraorbitalni sinusi fazana, 7 dana nakon veštačkog inficiranja. Na poprečnom preseku levog infraorbitalnog sinusa ističe sluz.

Promene u larinksu i traheji manifestovale su se u vidu crvenila sluznice i povećanog nakupljanja sluzi (slika 17). Kod dva fazana zapaženo je nakupljanje sluzavo-gnojnog sadržaja (slika 18).



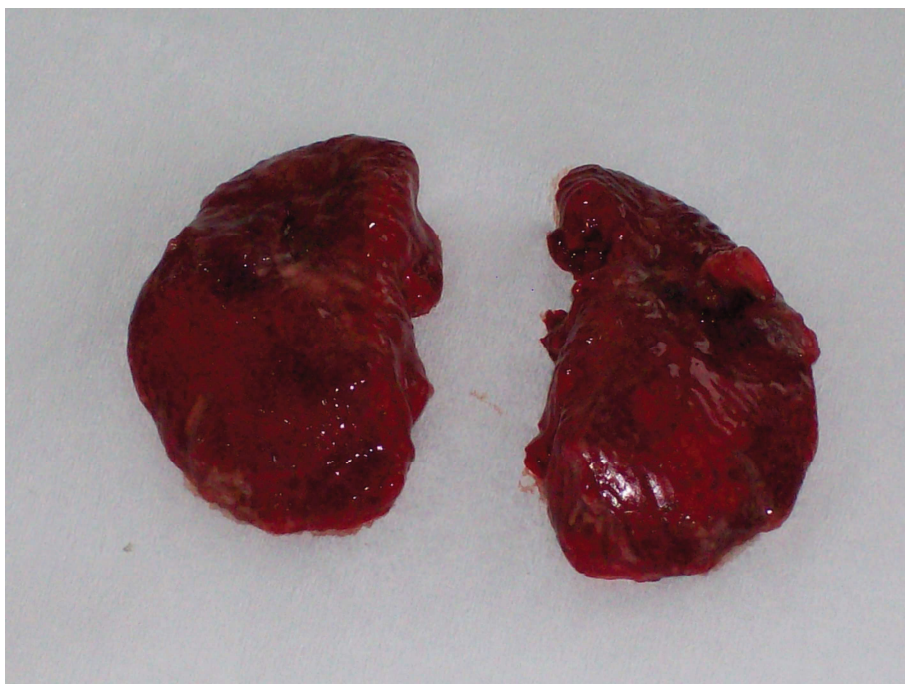
**Slika 17.** Larinks i traheja fazana, 7 dana nakon veštačkog inficiranja. Sluznica larinksa i traheje je zacrvenjena.



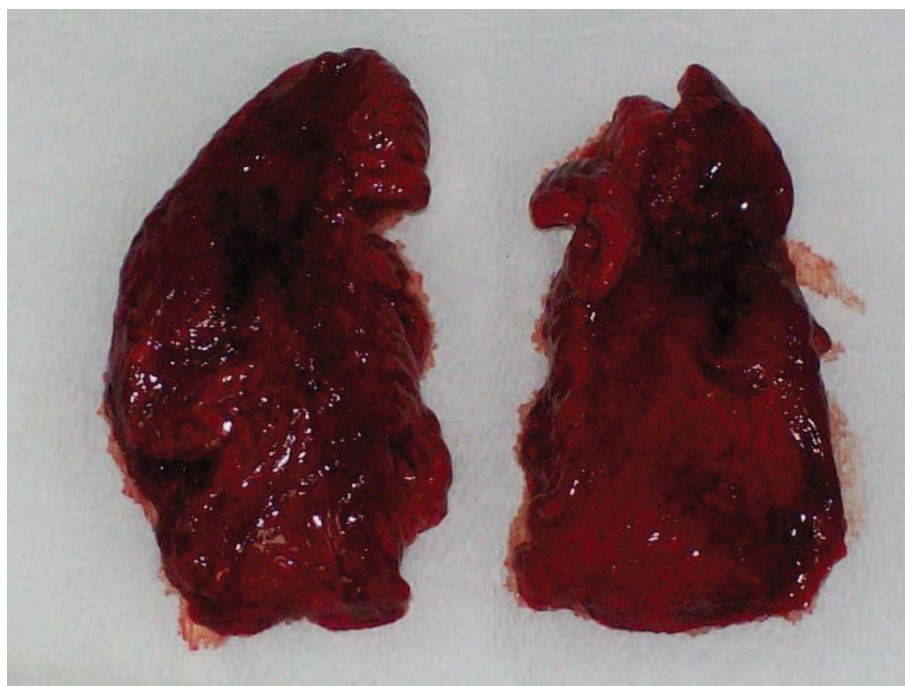
**Slika 18.** Traheja fazana, 7 dana nakon veštačkog inficiranja. U proksimalnom segmentu traheje zapaža se zacrvenjenost sluznice i nakupljanje mutne sluzi.

Pluća većine inficiranih fazana su bila uvećana, tamno-crvena, zaobljenih rubova, a sa preseka promenjenih pluća isticao je krvavo-penušav sadržaj, što odgovara hiperemiji i edemu (slika 19). U dva uzorka pluća zapažena su i hemoragična područja (slika 20).



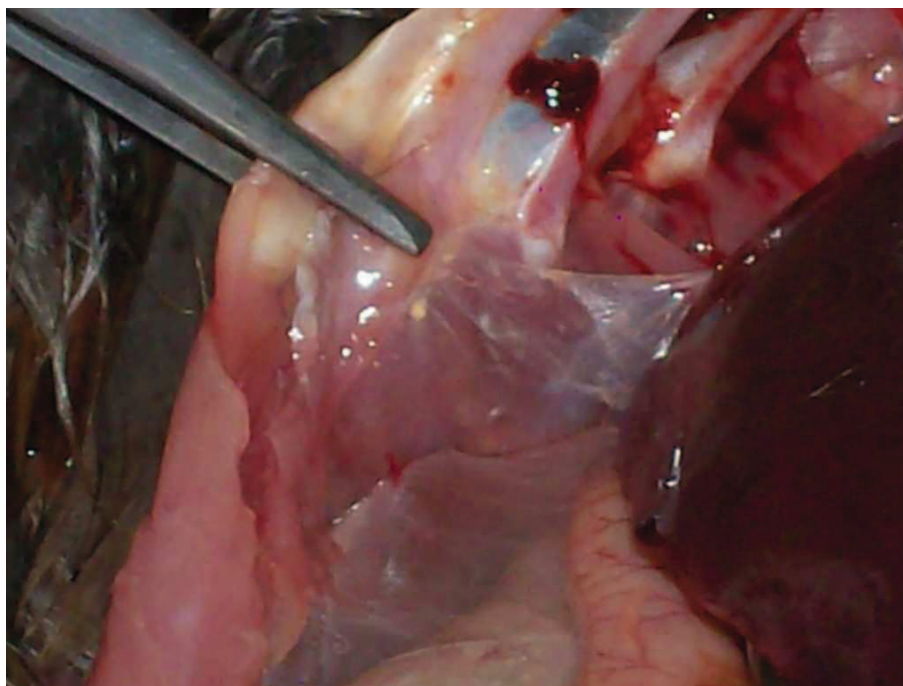


**Slika 19.** Pluća fazana, 12 dana nakon veštačkog inficiranja. Pluća su uvećana, sjajna, crvene boje, čvrste konzistencije (*Hyperaemia et oedema pulmonis*).

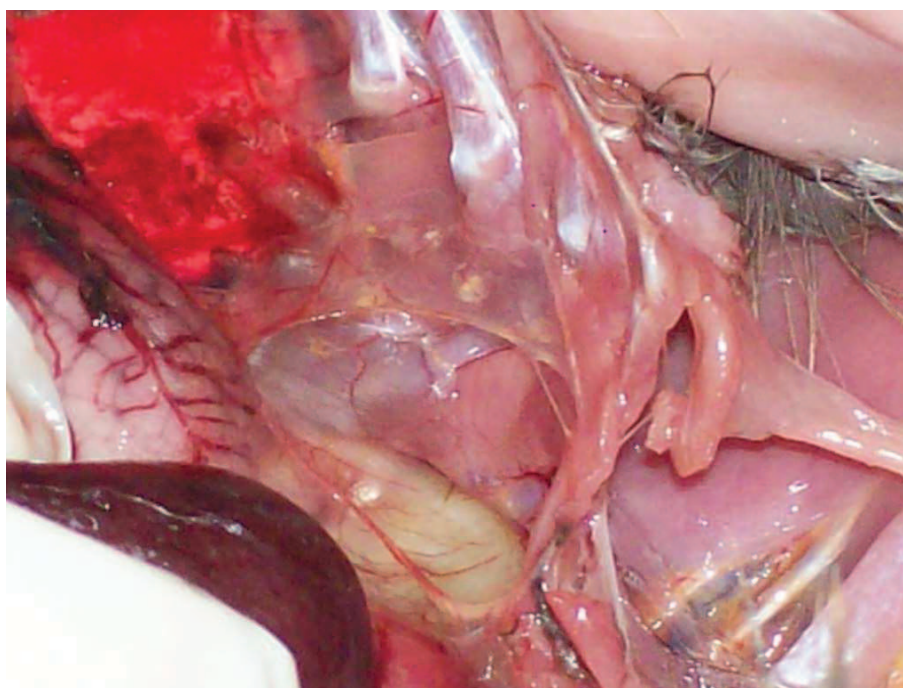


**Slika 20.** Pluća fazana, 7 dana nakon veštačkog inficiranja. Pluća su uvećana, crvene boje, čvrste konzistencije (*Hyperaemia et oedema pulmonis*), sa tamno-crvenim područjima (*Haemorrhagiae pulmonis*).

Na zidovima torakalnih vazdušnih kesa kod dva fazana zapažene su promene u vidu jasno lokalizovanih, malih, žućkastih, okruglih zadebljanja prečnika oko 2 mm, a kod jedne od ovih ptica slične promene su se javile i na abdominalnim vazdušnim kesama (slika 21 i 22).



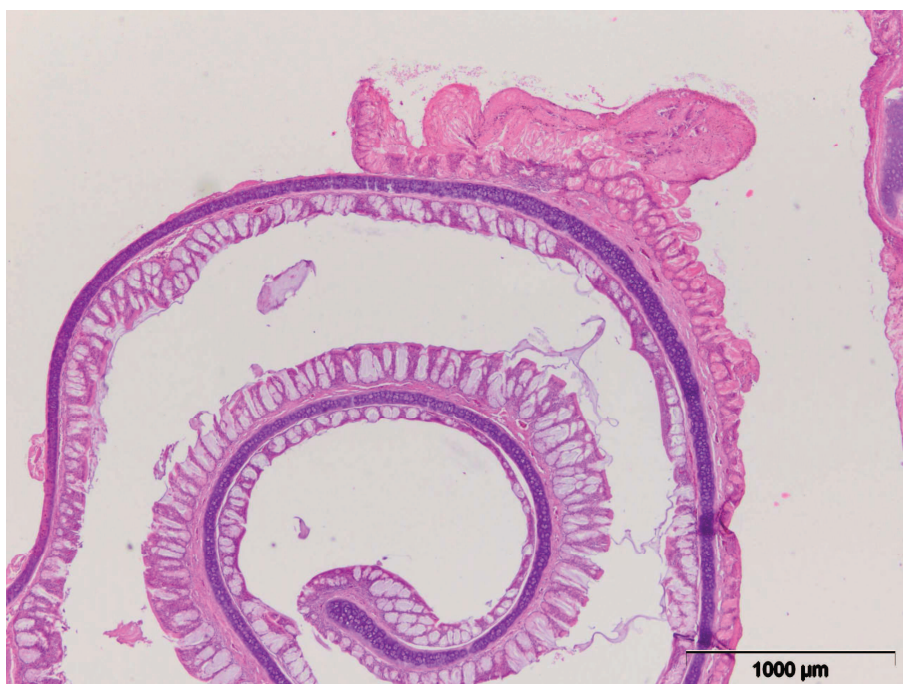
**Slika 21.** Abdominalna vazdušna kesa fazana, 12 dana nakon veštačkog inficiranja. Fokalno zadebljanje zida, žućkaste boje, prečnika oko 2 mm.



**Slika 22.** Torakalna vazdušna kesa fazana, 12 dana nakon veštačkog inficiranja. Fokalna zadebljanja zida, žućkaste boje, prečnika oko 2 mm.

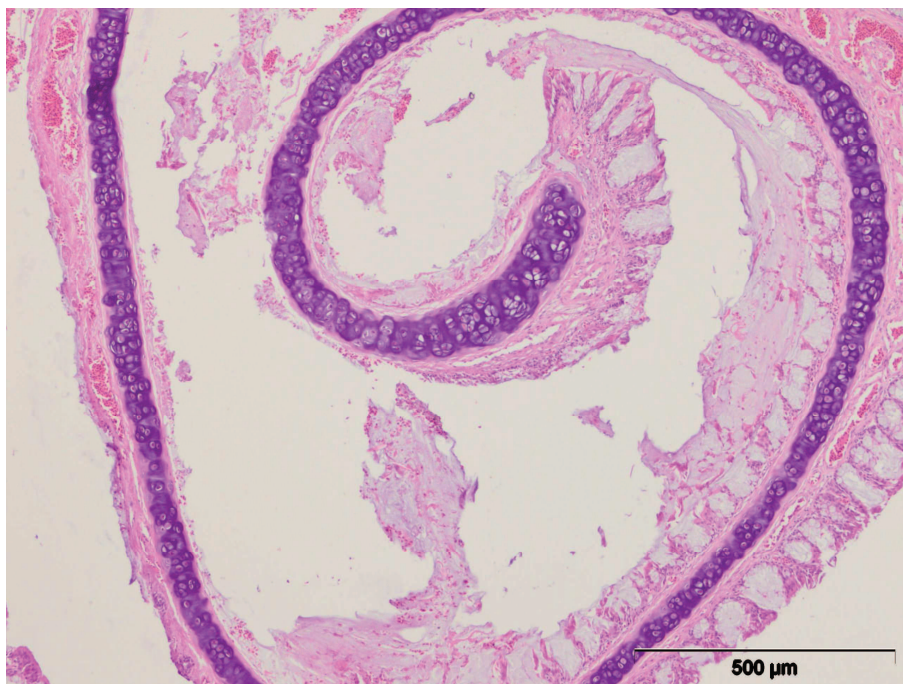
#### 5.2.3.2. Mikroskopski nalaz

Histopatološki nalaz u gornjim respiratornim putevima: nosnim šupljinama, infraorbitalnim sinusima, larinksu i traheji inficiranih fazana je sličan. U nosnim šupljinama je zapaženo nakupljanje veće količine sluzavog sadržaja u kojem su se nalazili eritrociti i heterofili (slika 23 i 24). U infraorbitalnim sinusima dva fazana nalazila se mala količina sluzi i po neka inflamatorna ćelija, a kod jednog fazana u infraorbitalnim sinusima se nalazio sluzavo-hemoragičan sadržaj i veći broj inflamatornih ćelija: limfocita i heterofila (slika 25).

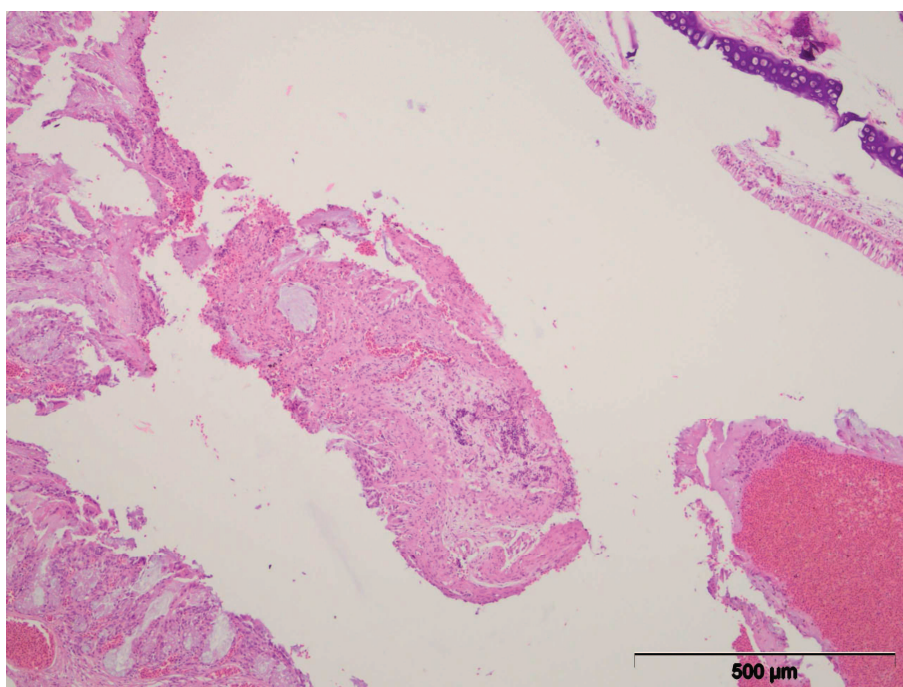


**Slika 23.** Nosna šupljina fazana, 12 dana posle veštačkog inficiranja. U nosnoj šupljini nalazi se veća količina sluzi (*Rhinitis catarrhalis*, HE).



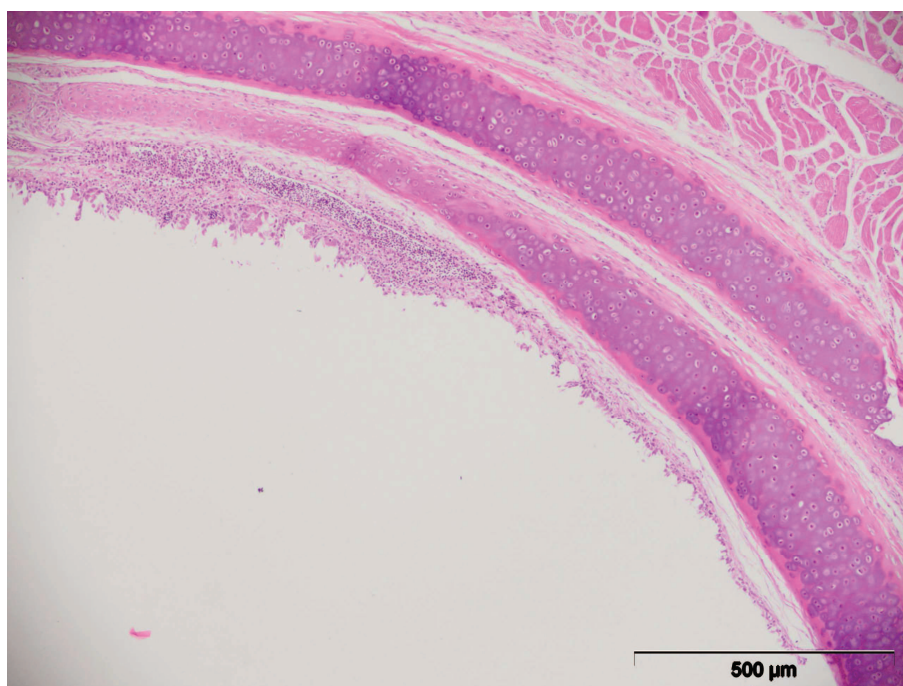


**Slika 24.** Nosna šupljina fazana, 7 dana posle veštačkog inficiranja. U nosnoj šupljini nalazi se velika količina sluzi, eritrociti i heterofili (*Rhinitis catarrhalis*, HE).



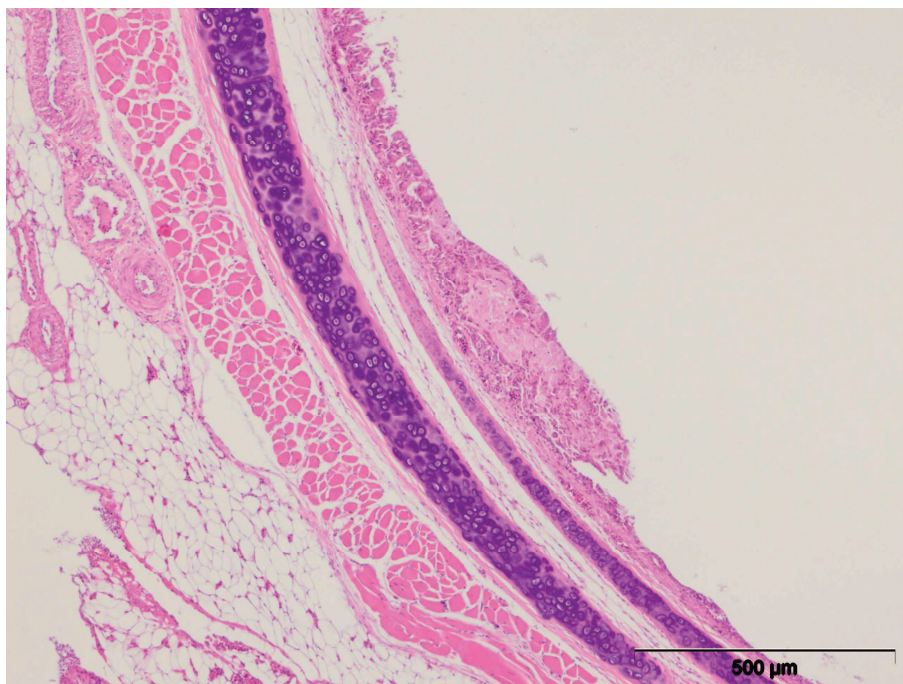
**Slika 25.** Infraorbitalni sinus fazana, 7 dana posle veštačkog inficiranja. U sinusu se nalazi velika količina sluzavog eksudata sa limfocitima, heterofilima i velikim brojem eritrocita (HE).

Histopatološki nalaz u larinksu i traheji većine uzoraka odgovara kataralnom zapaljenju. U lumenu se nalazila izvesna količina sluzavog do sluzavo-ćelijskog eksudata. U nekoliko uzoraka bila je izražena hiperplazija epitela, a na pojedinim delovima sluznice javile su se degenerativno-nekrotične promene i deskvamacija epitela (slika 26). Krvni sudovi lamine proprije mukoze larinksa i traheje bili su injicirani, a ćelijski infiltrat sastojao se iz heterofila, limfocita, monocita, i malog broja plazmocita (slika 27 i 28).

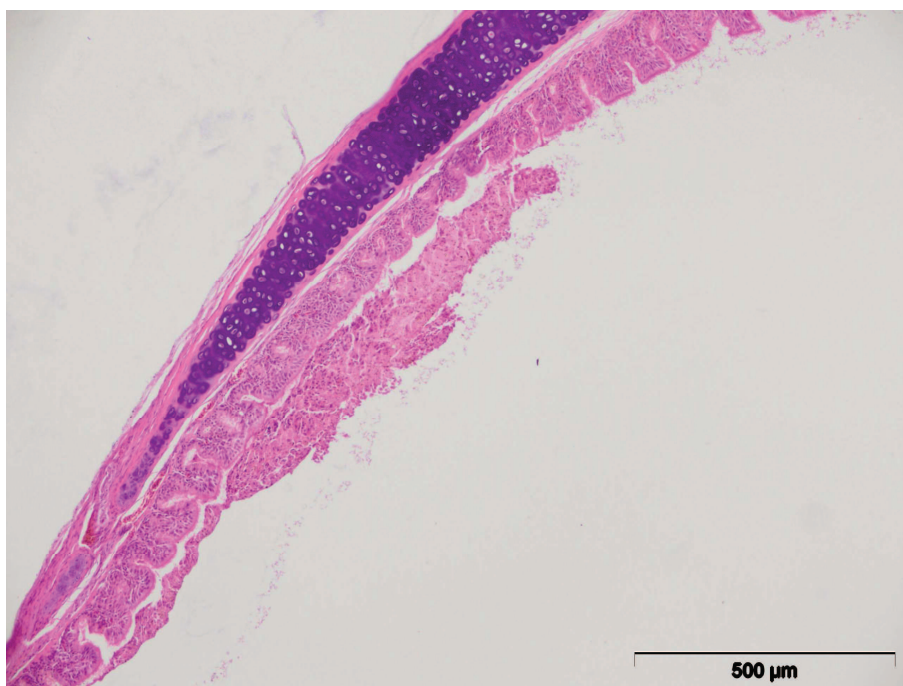


**Slika 26.** Traheja fazana, 7 dana posle eksperimentalnog inficiranja. Na epitelu su izražene degenerativno nekrotične promene i deskvamacija, a lamina proprija infiltrovana je heterofilima (HE).





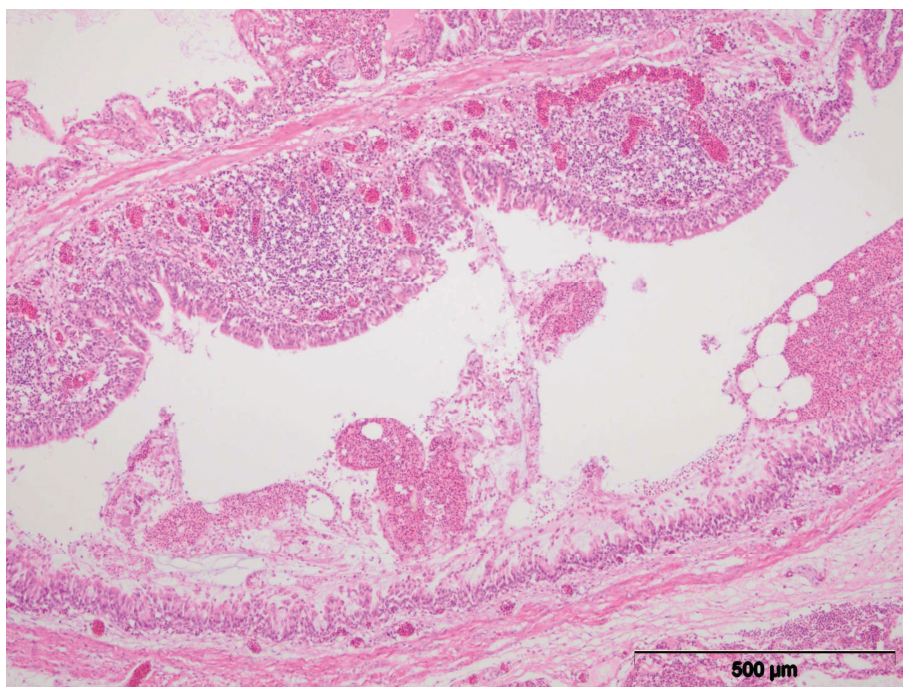
**Slika 27.** Traheja fazana, 7 dana posle veštačkog inficiranja. Na sluznici traheje nalazi se eksudat bogat heterofilima (HE).



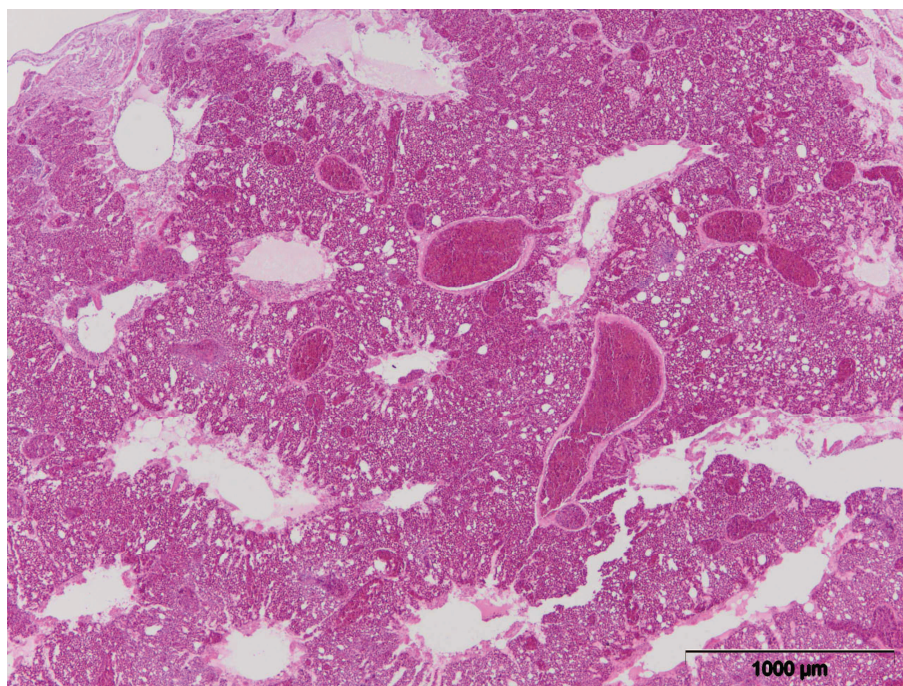
**Slika 28.** Traheja fazana, 7 dana posle veštačkog inficiranja. Epitel je zadebljao, a u lumenu traheje nalazi se eksudat bogat heterofilima (HE).

U primarnim bronhusima je, takođe, zabeleženo nakupljanje sluzavog sadržaja sa heterofilima (slika 29). Krvni sudovi lamine proprije mukoze su bili injicirani, a bio je prisutan i celularni infiltrat u kojem su se nalazili limfociti i heterofili. Dominantan histopatološki nalaz u plućima bila je hiperemija (slika 30). Krvni sudovi pluća bili su

prepuni krvi, a u lumenu parabronhija i atriya u dva uzorka zapažen je serozni eksudat sa malim brojem inflamatornih ćelija (slika 31).

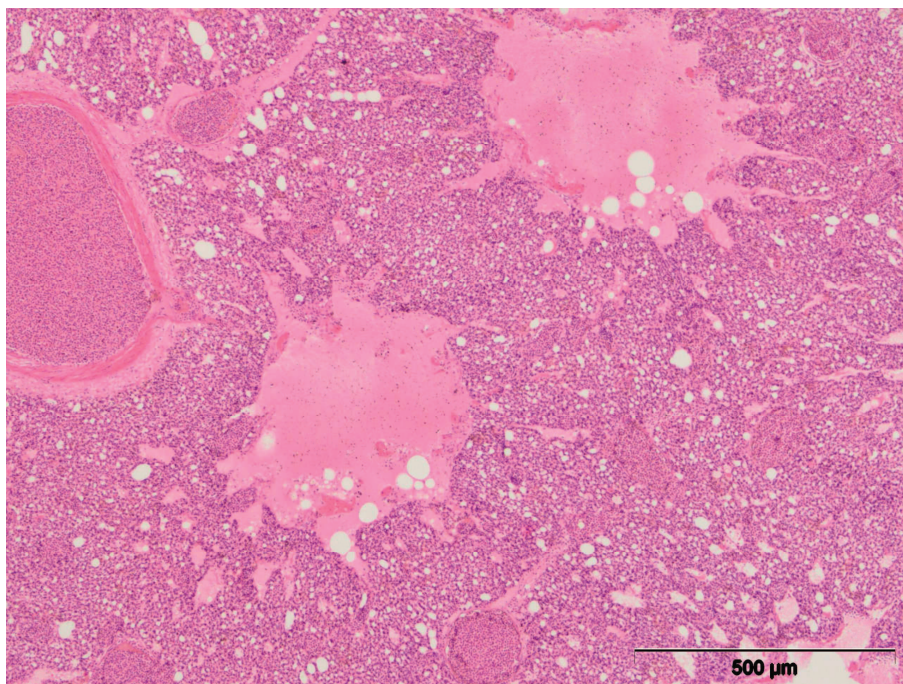


**Slika 29.** Pluća fazana, 12 dana posle veštačkog inficiranja.  
U bronhusu se nalazi eksudat bogat heterofilima, a lamina proprija je infiltrirana limfocitima i heterofilima (HE).



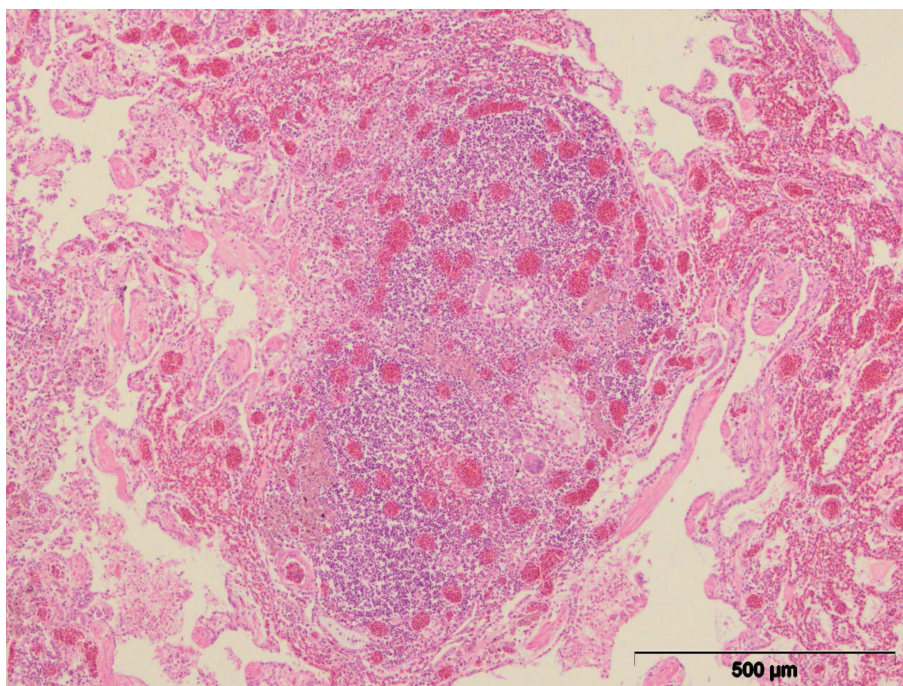
**Slika 30.** Pluća fazana, 12 dana posle veštačkog inficiranja.  
Hiperemija (HE).





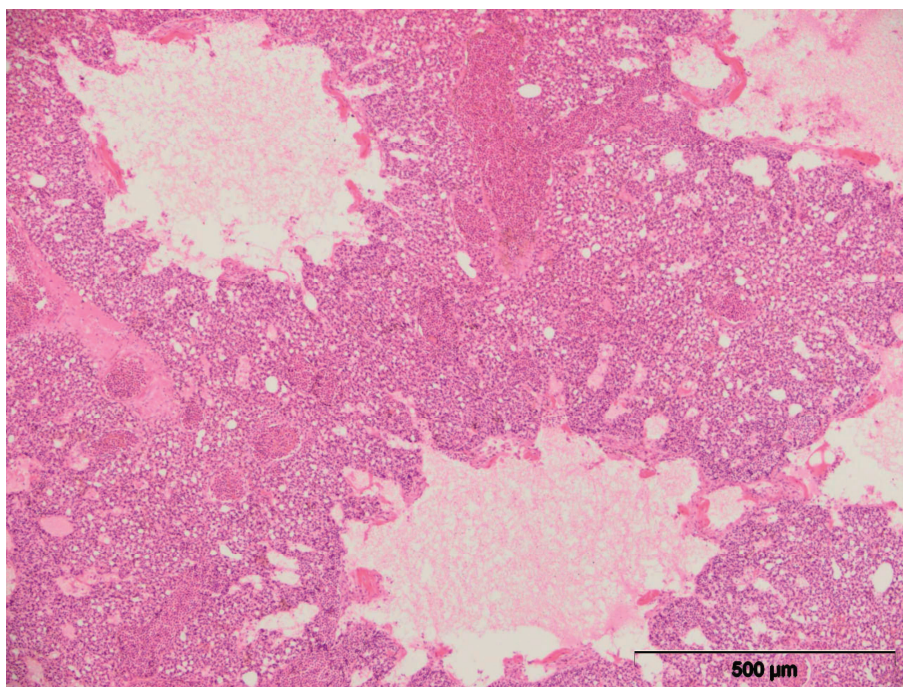
**Slika 31.** Pluća fazana, 7 dana posle veštačkog inficiranja.  
U parabronhijama i atrijama nalazi se serozni eksudat sa malim brojem heterofila i eritrocita (HE).

U uzorcima pluća dva fazana došlo je do formiranja granuloma. Oko nekrotičnog centra koncentrično slojevito su raspoređene epiteloidne ćelije, gigantociti, limfociti i fibroblasti (slika 32).



**Slika 32.** Pluća fazana, 12 dana posle veštačkog inficiranja.  
Granulomatozno zapaljenje (HE).

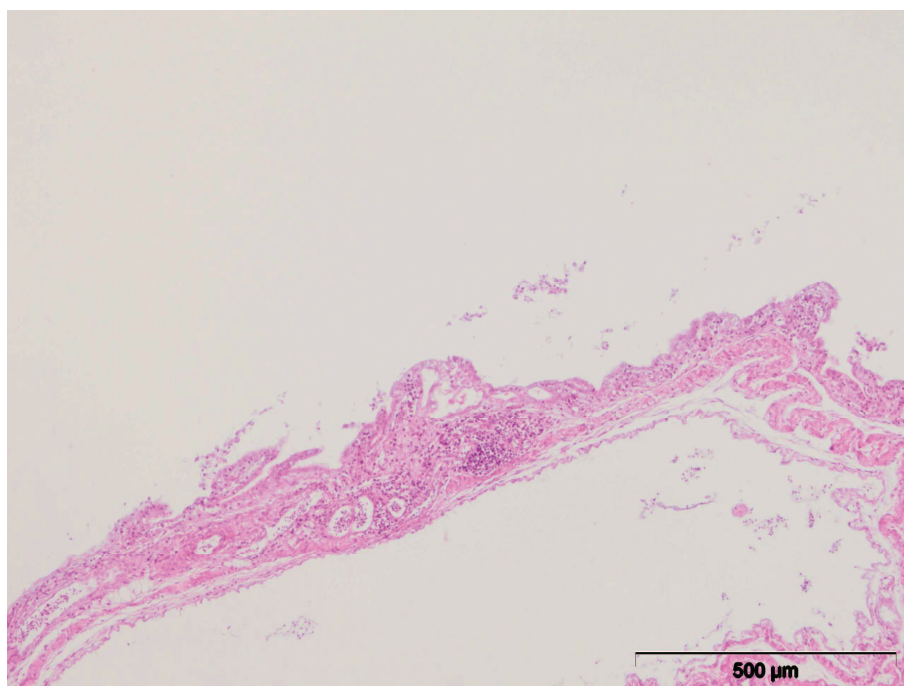
Kod dva fazana u plućima se razvila fibrinozna pneumonija. Lumen parabronhija i atrijsa ispunjen je fibrinoznim eksudatom u kojem se nalazi mali broj heterofila i eritrocita (slika 33).



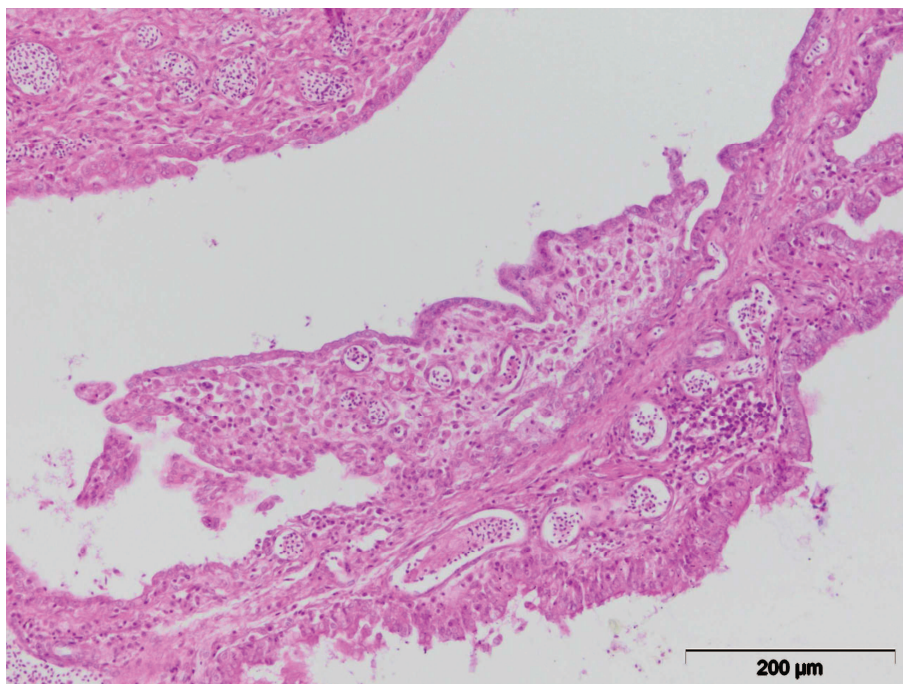
**Slika 33.** Pluća fazana, 7 dana posle eksperimentalnog inficiranja. U parabronhijama i atrijsama se nalazi fibrinozni eksudat sa malim brojem eritroca (HE).



Kod tri fazana zapažene su promene na vazдушnim kesama. Sa respiratorne strane zida vazдушnih kesa u jednom uzorku nalazio se celularni eksudat koji su činili pretežno monociti i heterofili. Na pojedinim mestima zapažena je degeneracija i nekroza respiratornog epitela. Subepitelno je uočena infiltracija mononuklearima i injiciranost krvnih sudova u tri uzorka. (slika 34 i 35).



**Slika 34.** Torakalna vazдушna kesa fazana, 12 dana posle veštačkog inficiranja. Celularni eksudat na respiratornoj površini i infiltracija zida vazdušne kese mononuklearima (HE).



**Slika 35.** Torakalna vazдушna kesa fazana, 12 dana posle veštačkog inficiranja. Nekroza epitela, zadebljali zidovi vazdušnih kesa usled infiltracije mononuklearima (HE).

Promene u respiratornim organima inficiranih fazana utvrđene su kod 7 ptica (tabela 17). Učestalost histopatoloških promena iznosila je 10-70% za pojedine organe. Rezultati su prikazani u tabelama 18-23.

**Tabela 17. Zastupljenost histopatoloških promena u respiratornim organima inficiranih fazana**

fazani	nos	sinusi	larinks	traheja	pluća	vazdušne kесе
1	+	+	-	-	+	-
2	+	-	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	-	+	+	+	+	+
8	-	-	+	+	+	+
9	+	-	+	+	+	-
10	-	-	-	-	+	-
ukupno	4	3	5	5	7	3
%	40	30	50	50	70	30

**Tabela 18. Učestalost ustanovljenih histopatoloških promena u nosnim šuplinama fazana inficiranih *O. rhinotracheale***

Tip promene	Učestalost promene (%)
Hiperemija	4/10 (40)
Eksudat u lumenu	3/10 (30)

**Tabela 19. Učestalost ustanovljenih histopatoloških promena u infraorbitalnim sinusima fazana inficiranih *O. rhinotracheale***

Tip promene	Učestalost promene (%)
Eksudat	3/10 (30)
Hemoragije	1/10 (10)

**Tabela 20. Učestalost ustanovljenih histopatoloških promena u larinksu fazana inficiranih *O. rhinotracheale***

Tip promene	Učestalost promene (%)
Hiperemija	4/10 (40)
Hiperplazija epitela	4/10 (40)
Degenerativno-nekrotične promene epitelnih ćelija	4/10 (40)
Deskvamacija epitela	3/10 (30)
Ćelijski infiltrat u lamini propriji	4/10 (40)
Eksudat u lumenu	5/10 (50)

**Tabela 21. Učestalost ustanovljenih histopatoloških promena u traheji fazana inficiranih *O. rhinotracheale***

Tip promene	Učestalost promene (%)
Hiperemija	5/10 (50)
Hiperplazija epitela	3/10 (30)
Degenerativno-nekrotične promene epitelnih ćelija	3/10 (30)
Deskvamacija epitela	3/10 (30)
Ćelijski infiltrat u lamini propriji	3/10 (30)
Eksudat u lumenu	5/10 (50)

**Tabela 22. Učestalost ustanovljenih histopatoloških promena u plućima fazana inficiranih *O. rhinotracheale***

Tip promene	Učestalost promene (%)
Hiperemija	7/10 (70)
Edem	2/10 (20)
Krvarenja	2/10 (20)
Serozni eksudat	2/10 (20)
Fibrinozni eksudat	2/10 (20)
Granulomatozno zapaljenje	2/10 (20)

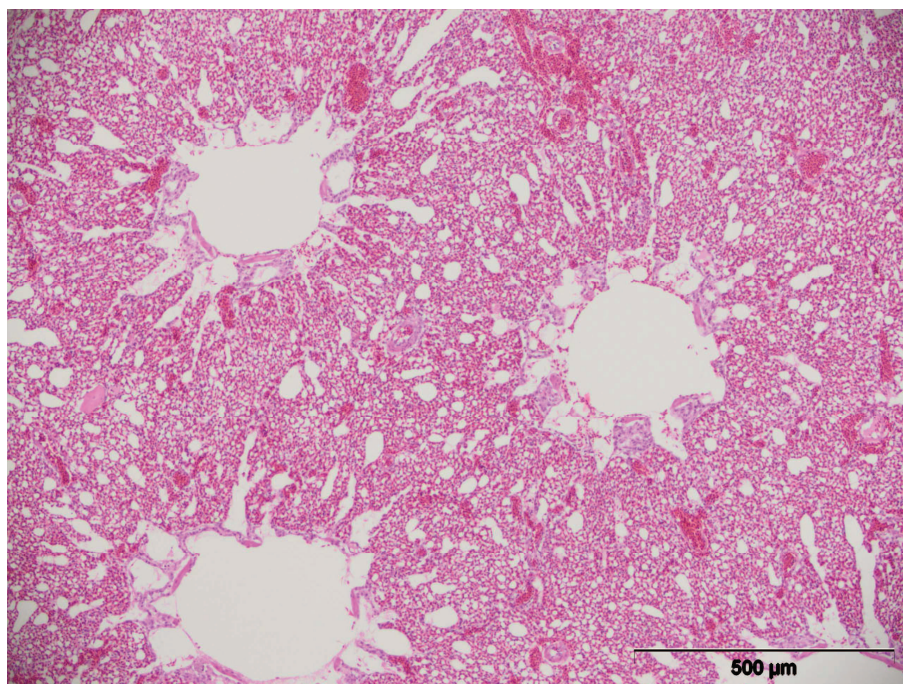
**Tabela 23. Učestalost ustanovljenih histopatoloških promena u vazдушnim kesama fazana inficiranih *O. rhinotracheale***

Tip promene	Učestalost promene (%)
Ćelijski infiltrat u zidu	3/10 (30)
Degenerativno-nekrotične promene epitelnih ćelija	1/10 (10)
Eksudat u vazдушnim kesama	1/10 (10)



#### 5.2.4. Patomorfološke promene kod fazana iz kontrolne grupe

Kod fazana iz kontrolne grupe utvrđena je blaga hiperemija pluća kod pojedinih ptica. U ostalim organima nisu utvrđene vidljive patoanatomske promene. Mikroskopskim pregledom utvrđena je blaga hiperemija pluća kod 3 fazana, dok transudata u vazдушnim putevima nije bilo (slika 36). U uzorcima ostalih respiratornih organa nisu utvrđene histopatološke promene.



**Slika 36.** Pluća fazana iz kontrolne grupe, žrtvovanog 7 dana nakon veštačkog inficiranja. U parabronhijama nema inflamatornog eksudata.

### 5.3 Rezultati bakteriološkog ispitivanja

Uzorci unutrašnjih organa svake od ptica ispitivani su pojedinačno. Paralelno sa uzorcima ispitivan je i referentni bakterijski soj kojim je izazvana infekcija, kako bi mogli da budu upoređivani rezultati. Rast referentnog soja *O. rhinotracheale* B3263/91 na Kolumbija krvnom agaru i rezultati biohemijskih reakcija u API sistemu prikazani su na slikama 37 i 38.



**Slika 37.** Izgled kolonija referentnog soja *O. rhinotracheale* B3263/91 na Kolumbija krvnom agaru

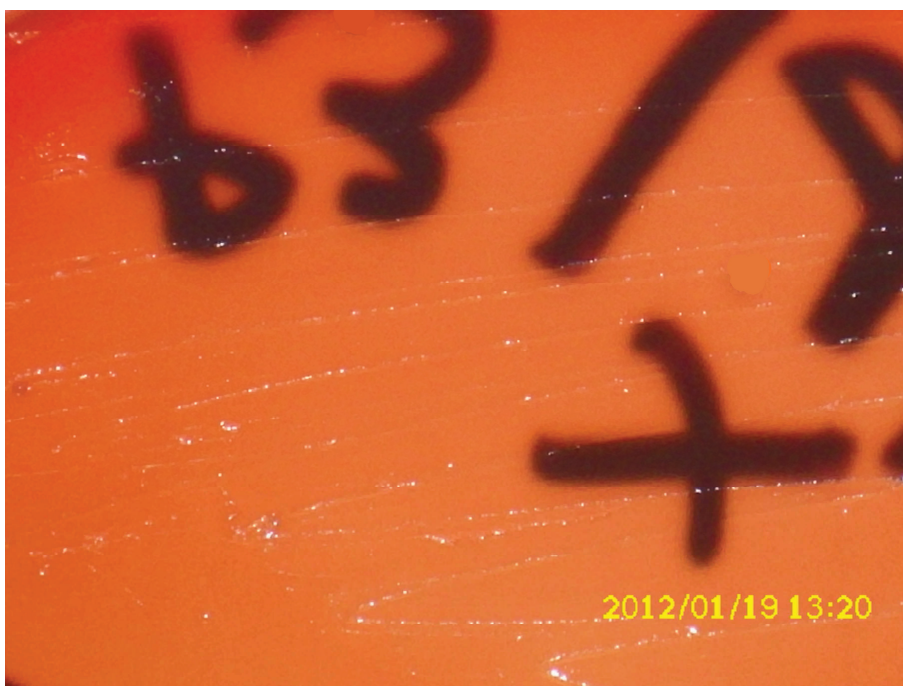


**Slika 38.** Rezultati biohemijskih testova u API sistemu za referentni bakterijski soj.

Uzorci su zasejavani istovremeno na po dve hranljive podloge: agar sa ovčijom krvi i gentamicinom i Kolumbija krvni agar. Nakon inkubacije u trajanju od 48 časova pod mikroaerofilnim uslovima očitavani su rezultati. Kolonije *O. rhinotracheale* bile su veoma male, prečnika oko 1 mm, cirkularne, konveksne i sivkasto-bele boje. Iz pojedinih uzoraka rasle su kolonije prečnika manjeg od 1 mm, čije su morfološke karakteristike proveravane pod lupom (slika 39 i 40).



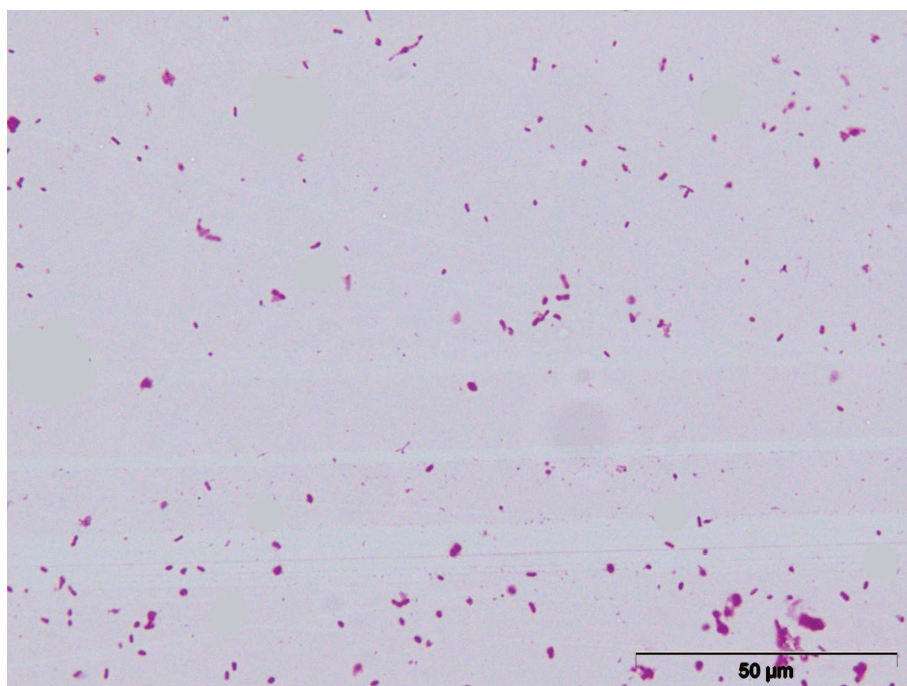
**Slika 39.** Izgled kolonija *O. rhinotracheale* na Kolumbija krvnom agaru, izraslih iz larinksa veštački inficiranog fazana.



**Slika 40.** Izgled kolonija *O. rhinotracheale* na krvnom agaru sa ovčijom krvi i gentamicinom, izraslih iz pluća veštački inficiranog fazana.



Posle dobijanja čiste kulture vršena je primarna identifikacija bakterija tako što su od svih sumnjivih kolonija pravljene mikroskopski preparati i bojeni po Gramu. Sumnjivi izolati bili su gram-negativni i izrazito pleomorfni. Na preparatu su se mogle videti sitne pojedinačne bakterijske ćelije šljivolikog oblika različitih dimenzija, kao i nizovi formirani od bakterijskih ćelija različite dužine i širine, slika 41.



**Slika 41.** Na mikroskopskom preparatu zapaža se izrazit pleomorfizam gram-negativno obojenih bakterijskih ćelija.

Sumnjive kolonije presejavane su na „MacConkey“ agar i na Kliglerov agar sa trostrukim šećerom i gvožđem. Uzročnik nije rastao na „MacConkey“ agaru i agaru sa trostrukim šećerom i gvožđem. Izvođeni su testovi oksidaze, katalaze i konvencionalni biohemijski testovi: reakcija sa metil crvenim (Voges-Proskauer reakcija), dokazivanje stvaranja indola i ONPG test. Izolati *O. rhinotracheale* davali su pozitivnu reakciju u oksidaza, a negativnu u katalaza testu, Voges-Proskauer reakcija i ONPG test bili su pozitivni, a reakcija stvaranja indola negativna. Konačna identifikacija izvršena je primenom komercijalnog test kita za biohemijsku identifikaciju „API 20 NE“ proizvođača „bioMérieux“, Francuska. Svi izolati su davali šifru 0020004 (slika 42). U tabeli 24 prikazani su biohemijski testovi koji su korišćeni za identifikaciju uzročnika.



**Slika 42.** Rezultati biohemijskih reakcija za identifikaciju u API sistemu, za tri izolata *O. rhinotracheale* iz organa veštački inficiranih fazana.

**TABELA 24. Rezultati ispitivanja biohemijskih osobina *O. rhinotracheale* soj B 3263/91, nakon izolacije iz organa veštački inficiranih fazana**

Hranljiva podloga/biohemijski test	rezultat
„MacConkey“ agar	-
agar sa trostrukim šećerom i gvožđem	-
oksidaza	+
katalaza	-
Voges-Proskauer test	+
formiranje indola	-
$\beta$ -Galaktozidaza	+
redukcija nitrata	-
fermentacija glukoze	-
arginin-dihidrolaza	-
ureaza	-
$\beta$ -Glukozidaza	-
razlaganje želatina (proteaza)	-
D-glukoza (asimilacija)	-
L-arabinoza (asimilacija)	-
D-manoza (asimilacija)	-
D-manitol (asimilacija)	-
N-acetil-glukozamin (asimilacija)	-
D-maltoza (asimilacija)	-
kalijum-glukonat (asimilacija)	-
kaprinska kiselina (asimilacija)	-
adipinska kiselina (asimilacija)	-
jabučna kiselina (asimilacija)	-
natrijum-citrat (asimilacija)	-
fenil-sirćetna kiselina (asimilacija)	-

Bakteriološkim ispitivanjem obuhvaćeni su uzorci organa: nosnih šupljina, infraorbitalnih sinusa, larinksa, traheje, pluća, srca, slezine, jetre i bubrega, kao i brisevi vazdušnih kesa ptica iz inficiranih i kontrolnih grupa. Uzročnik nije reizolovan iz organa inficiranih brojerskih roditelja niti je izolovan iz brojerskih roditelja i fazana iz kontrolnih grupa (tabela 25).



**Tabela 25. Rezultati bakteriološkog ispitivanja organa ptica iz inficiranih i kontrolnih grupa na *O. rhinotracheale***

Grupe:	Broj pregledanih/broj pozitivnih uzoraka						
	nosne šupljine	sinusi	larinks	traheja	pluća	v. kese	ostali organi*
fazani iz inficirane grupe	10/0	10/4	10/3	10/1	10/5	10/0	10/0
fazani iz kontrolne grupe	6/0	6/0	6/0	6/0	6/0	6/0	6/0
kokoši iz inficirane grupe	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
kokoši iz kontrolne grupe	6/0	6/0	6/0	6/0	6/0	6/0	6/0

\*srce, slezina, jetra, bubreg

Uzročnik je reizolovan iz respiratornih, ali ne i iz drugih organa inficiranih fazana. Reizolacija je bila uspešna iz organa osam ptica što čini 80% od ukupnog broja inficiranih ptica. Uzročnik je izolovan iz traheje jedne ptice, larinksa tri ptice, infraorbitalnih sinusa četiri ptice i pluća pet ptica (tabela 26).

**Tabela 26. Rezultati bakteriološkog pregleda organa inficiranih fazana na *O. rhinotracheale***

N	nosne šupljine	sinusi	larinks	traheja	pluća	v. kese	ostali organi*
1	-	+	-	-	+	-	-
2	-	-	-	+	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	+	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-
6	-	+	+	-	-	-	-
7	-	+	-	-	+	-	-
8	-	+	-	-	+	-	-
9	-	-	-	-	+	-	-
10	-	-	+	-	+	-	-
ukupno	0	4	3	1	5	0	0

\*srce, slezina, jetra, bubreg

#### 5.4. Rezultati serološkog ispitivanja

Pre uvođenja u ogled, ispitani su uzorci krvi svih ptica na prisustvo specifičnih antitela za *O. rhinotracheale* i dobijen je negativan rezultat. Sedmog dana nakon veštačkog inficiranja, ispitani su uzorci krvi po 6 žrtvovanih ptica iz inficirane grupe fazana i inficirane grupe kokoši brojlerskih roditelja, i po četiri ptice iz kontrolnih grupa. Kod inficiranih ptica utvrđene su visoke vrednosti titra specifičnih antitela, dok su uzorci krvi ptica iz kontrolnih grupa reagovali negativno. Vrednosti titra specifičnih antitela u krvi kokoši brojlerskih roditelja kretale su se od 5878 do 15431, srednja vrednost iznosila je 11073 (tabela 27). Vrednosti titra specifičnih antitela protiv *O. rhinotracheale* u krvi fazana iznosile su od 3736 do 8587, srednja vrednost iznosila je 6643 (tabela 28). Dvanaestog dana posle inficiranja, ispitani su uzorci krvi po 6 ptica iz inficiranih grupa (4 uzorka od žrtvovanih i po dva od preostalih inficiranih ptica) kao i po dva uzorka ptica iz kontrolnih grupa. Dobijene vrednosti titra specifičnih antitela u krvi inficiranih ptica bile su slične kao u prethodnom ispitivanju, a kod ptica iz kontrolnih grupa nije utvrđeno prisustvo specifičnih antitela. Vrednosti titra specifičnih antitela u krvi kokoši brojlerskih roditelja kretale su se od 7312 do 10766, srednja vrednost iznosila je 8662. Vrednosti titra specifičnih antitela u krvi fazana iznosile su od 3980 do 8685, srednja vrednost iznosila je 6805.

U narednom periodu ispitivana je krv od po 6 preostalih inficiranih ptica na svake dve nedelje. Srednja vrednost titra specifičnih antitela u krvi kokoši brojlerskih roditelja, 4 nedelje posle eksperimentalnog inficiranja iznosila je 2372, a u periodu vršenja analiza 6 do 12 nedelja od inficiranja dobijene su srednje vrednosti titra specifičnih antitela 2333, 2265, 2203, 1564. Nakon 14 i 16 nedelja od inficiranja nivo antitela je bio ispod granične vrednosti primenjenog dijagnostikuma za poglašavanje uzorka pozitivnim. Srednja vrednost titra specifičnih antitela u krvi fazana, 4 nedelje posle veštačkog inficiranja, iznosila je 2601, a u periodu vršenja analiza 6 do 12 nedelja od inficiranja dobijene su vrednosti 2335, 2205, 2134, 1594. Nakon 14 i 16 nedelja od inficiranja, svi ispitani uzorci su reagovali negativno.

**Tabela 27. Rezultati ipitivanja prisustva specifičnih antitela za *O. rhinotracheale* kod kokoši brojlerskih roditelja, nakon eksperimentalnog inficiranja (ELISA)**

Redni broj uzorka	Vreme proteklo od eksperimentalnog inficiranja								
	7 dana	12 dana	4 nedelje	6 nedelja	8 nedelja	10 nedelja	12 nedelja	14 nedelja	16 nedelja
1	9640	10766	2901	1649	2618	1876	1536	622	376
2	15431	9132	2361	1979	2454	1514	1865	748	336
3	13098	7708	2548	2442	2326	2641	1762	833	601
4	5878	9188	2688	2783	2677	2221	1660	653	653
5	11870	7312	2106	2407	1536	2407	1491	477	748
6	10520	7863	1626	2736	1979	2559	1071	447	685
$X_{\min}$	5878	7312	1626	1649	1536	1514	1071	447	336
$X_{\max}$	15431	10766	2901	2783	2677	2641	1865	833	748
$\bar{X}$	11073	8662	2372	2333	2265	2203	1564	630	567
SD	3258	1288	456	442	435	434	279	150	170
$S_x$	1330	526	186	180	178	177	114	61	70
CV	29%	15%	19%	19%	19%	20%	18%	24%	30%

**Tabela 28. Rezultati ipitivanja prisustva specifičnih antitela za *O. rhinotracheale* kod fazana, nakon eksperimentalnog inficiranja (ELISA)**

Redni broj uzorka	Vreme proteklo od eksperimentalnog inficiranja								
	7 dana	12 dana	4 nedelje	6 nedelja	8 nedelja	10 nedelja	12 nedelja	14 nedelja	16 nedelja
1	7652	8573	2877	3594	3378	3402	2419	769	549
2	4633	8685	3282	1739	2442	1751	1739	570	539
3	8148	4442	1739	2442	1536	2198	962	674	336
4	7099	8573	1968	1899	1626	1671	1413	239	239
5	8587	6578	3884	1762	1876	1536	1604	539	336
6	3736	3980	1853	2571	2372	2244	1424	653	570
$X_{\min}$	3736	3980	1739	1739	1536	1536	962	239	239
$X_{\max}$	8587	8685	3884	3594	3378	3402	2419	769	570
$\bar{X}$	6643	6805	2601	2335	2205	2134	1594	574	428
SD	1988	2163	882	711	686	684	482	183	141
$S_x$	812	883	360	290	280	279	197	75	58
CV	30%	32%	34%	30%	31%	32%	30%	32%	33%

Prilikom uvođenja ptica u ogled i prilikom žrtvovanja 7. i 12. dana od inficiranja, ispitani su uzorci krvnog seruma ptica na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa atipične kuge živine, virusa infektivnog bronhitisa, pneumovirusa, virusa avijarne influence, *M. gallisepticum* i *M. synoviae* kako bi se isključio uticaj navedenih infektivnih agenasa na pojavu patomorfoloških promena u respiratornim organima.

Kod fazana je utvrđeno prisustvo specifičnih antitela za virus atipične kuge živine dok antitela protiv virusa infektivnog bronhitisa, pneumovirusa, virusa avijarne influence, *M. gallisepticum* i *M. synoviae* u parnim uzorcima krvnog seruma fazana nisu utvrđena.

Prilikom uvođenja fazana u ogled dobijene su vrednosti titra specifičnih antitela za virus atipične kuge živine: 810, 2579, 4043, 5614, 7192, 2550, 2565, 4058, 1737, 3475, 2885, 4968, 1878, 4984, 6344, 3208, 2565, 4073, 3061, 4694, 1751, 3371;  $\bar{X} = 3564$ ; SD = 1589; CV = 45%.

Kod fazana iz inficirane grupe, žrtvovanih 7. dana dobijene su vrednosti titra: 929, 2420, 4013, 5753, 7444, 2449;  $\bar{X} = 3835$ ; SD = 2412; CV = 63%.

Kod fazana iz kontrolne grupe, žrtvovanih 7. dana dobijene su vrednosti titra: 2478, 4163, 1822, 3505;  $\bar{X} = 2992$

Kod fazana iz inficirane grupe, žrtvovanih 12. dana dobijene su vrednosti titra: 2608, 4678, 1723 i 4709;  $\bar{X} = 3429$

Kod fazana iz kontrolne grupe, žrtvovanih 12. dana dobijene su vrednosti titra: 6219 i 2914.

Kod kokoši je utvrđeno prisustvo specifičnih antitela za virus atipične kuge živine i virus infektivnog bronhitisa, dok prisustvo antitela protiv ostalih ispitivanih uzročnika respiratornih infekcija nije ustanovljeno.

Prilikom uvođenja u ogled, vrednosti titra specifičnih antitela za virus atipične kuge živine kod kokoši iznosile su: 9959, 11968, 7302, 14522, 8414, 12066, 10479, 9458, 7555, 4907, 14088, 11082, 14790, 9474, 5568, 11344, 10919, 15511, 12693, 11229, 8718, 6516;  $\bar{X} = 10389$ ; SD = 2958; CV = 28%

Kod kokoši iz inficirane grupe, žrtvovanih 7. dana dobijene su vrednosti titra: 13988, 11049, 14622, 9619, 5908, 11049;  $\bar{X} = 11039$ , SD = 3158, CV = 29%

Kod kokoši iz kontrolne grupe, žrtvovanih 7. dana dobijene su vrednosti titra: 10690, 14355, 12515, 11017;  $\bar{X} = 12143$

Kod kokoši iz inficirane grupe, žrtvovanih 12. dana dobijene su vrednosti titra: 7381, 13024, 8590, 12231;  $\bar{X} = 10306$ .

Kod kokoši iz kontrolne grupe, žrtvovanih 12. dana dobijene su vrednosti titra: 8494, 5599.

Vrednosti titra specifičnih antitela za virus infektivnog bronhitisa na dan uvođenja ptica u ogled iznosile su: 9139, 8223, 8916, 4964, 8549, 6290, 7161, 4615, 8811, 7251, 5934,

7109, 4059, 8549, 8602, 7328, 6022, 5630, 6775, 6137, 7989, 4256;  $\bar{X} = 6923$ ; SD = 1585; CV = 23%.

Kod kokoši iz inficirane grupe, žrtvovanih 7. dana dobijene su vrednosti titra: 9271, 8067, 8995, 5139, 8223, 6086;  $\bar{X} = 7630$ ; SD = 1655; CV = 22%.

Kod kokoši iz kontrolne grupe, žrtvovanih 7. dana dobijene su vrednosti titra: 7367, 4740, 8445, 7071;  $\bar{X} = 6906$ .

Kod kokoši iz inficirane grupe, žrtvovanih 12. dana dobijene su vrednosti titra: 6022, 7290, 3887, 8484;  $\bar{X} = 6421$ .

Kod kokoši iz kontrolne grupe, žrtvovanih 12. dana dobijene su vrednosti titra: 8471, 7445.

## 6. DISKUSIJA

*O. rhinotracheale* je novootkriveni uzročnik respiratornih infekcija ptica (van Beek i saradnici, 1994), čija je klasifikacija izvršena 1994. godine (Vandamme i saradnici, 1994). Veoma je rasprostranjen kod živine u intenzivnoj proizvodnji širom sveta (Hafez i Sting, 1996; Ryll i saradnici, 1997; Canal i saradnici, 2003; Chansiripornchai i saradnici, 2007) što je potvrđeno i u Republici Srbiji (Gavrilović, 2009). I pored toga, uloga ovog uzročnika u patologiji respiratornih bolesti ptica nije dovoljno poznata i još uvek se istražuje. Mišljenja naučnika o patogenosti uzročnika idu u dva pravca. Jedni smatraju da je *O. rhinotracheale* primarni patogen (Ryll i saradnici, 1996; Travers i saradnici, 1996; Sprenger i saradnici, 1998; van Veen i saradnici, 2000b), a drugi da je za izbijanje infekcije neophodno dejstvo drugih mikroorganizama (van Empel i saradnici, 1996; Back i saradnici, 1997; Droual i Chin, 1997; Franz i saradnici, 1997; van Empel i saradnici, 1999).

S obzirom da uloga *O. rhinotracheale* u patologiji respiratornih bolesti ptica nije u potpunosti razjašnjena, opredelili smo se da u eksperimentalnim uslovima ispitamo uticaj ove bakterije na pojavu patomorfoloških promena u respiratornim organima kokoši brojlerskih roditelja i fazana.

Amonsin i saradnici (1997) su ispitivanjem 55 izolata *O. rhinotracheale* primenom PCR metode ustanovili da imaju ograničenu heterogenost i da pripadaju maloj grupi blisko udruženih klonova. Na ovakvim saznanjima zasniva se pretpostavka naučnika da su ove bakterije u skorije vreme prešle sa divljih na domaće vrste ptica (Chin i saradnici, 2003), što je bio jedan od razloga da za eksperiment odaberemo srodnu domaću i divlju vrstu ptica. U literaturi ima veoma malo podataka o kliničkoj slici kod kokoši brojlerskih roditelja (Hafez, 1996), dok podaci o patomorfološkim promenama ne postoje, kao ni podaci o ornitobakteriozi fazana. Pored navedenih razloga za izbor vrsta ptica koje će se koristiti u ogledu, smatrali smo da je značajno da se uporedi prijemчивost kokoši brojlerskih roditelja kao visoko selekcionisane vrste na određene osobine, značajne za komercijalnu proizvodnju i srodne prirodno selekcionisane divlje vrste iz iste supfamilijske - *Phasianinae*.



Sprovedena ispitivanja imala su za cilj da se utvrdi uticaj *O. rhinotracheale* na razvoj patomorfoloških promena u respiratornim organima i zdravstveno stanje kokoši brojlerskih roditelja i fazana iz odgoja. Kod inficiranih ptica praćen je i serološki odgovor tokom 16 nedelja nakon veštačkog inficiranja.

Za eksperiment su odabrane ptice koje nisu bile u kontaktu sa uzročnikom što je potvrđeno serološkim ispitivanjem uzoraka krvi ptica iz jata iz kojih su izdvojene ptice za eksperiment, dva puta u razmaku od 3 nedelje, kao i bakteriološkim ispitivanjem uzoraka trahealnih briseva i serološkim ispitivanjem uzoraka krvi sve 44 odabrane ptice.

Soj *O. rhinotracheale* B3263/91 je jedan od prvih izolovanih sojeva ove bakterije u svetu. Izolovan je iz organa obolelih brojlera, 1991. godine u južnoj Africi. Van Veen i saradnici (2000b) su istraživali virulentnost različitih sojeva *O. rhinotracheale* i ustanovili da je južnoafrički soj B3263/91 virulentniji od američkih sojeva zbog čega smo se opredelili da ovim sojem izazovemo infekciju. Većina naučnika koji su istraživali eksperimentalnu infekciju aplikovali su *O. rhinotracheale* oglednim pticama u koncentraciji  $10^8$  do  $10^9$  CFU/ml, aerosolom (van Empel i saradnici, 1996; van Veen i saradnici, 2000b; Kilic i saradnici, 2009). Sprenger i saradnici (1998) izazvali su kliničke manifestacije i patomorfološke promene u respiratornim organima ćuraka, intratrahealnom aplikacijom suspenzije *O. rhinotracheale* u koncentraciji  $10^{10}$  CFU/ml. Imajući u vidu navedene podatke opredelili smo se da za eksperimentalnu infekciju koristimo suspenziju sa visokom koncentracijom bakterija ( $10^{11}$  CFU/ml) za koju u literaturi nije bilo podataka da je korišćena. Pored primene suspenzije sa visokom koncentracijom bakterija, uzročnik je favorizovan u odnosu na domaćina i intratrahealnim načinom aplikovanja suspenzije bakterijskih kolonija čime je zaobiđen deo nespecifičnih odbrambenih mehanizama nosa, larinksa i traheje. Ovakvim pristupom favorizovanja uzročnika i stvaranja što optimalnijih uslova za nastanak infekcije, nastojali smo da utvrdimo da li *O. rhinotracheale* može kod zdravih ptica, gajenih na uobičajen način, za određene namene da prouzrokuje bolest i kakav je serološki odgovor inficiranih ptica. Drugim rečima, eksperiment je tako koncipiran da bi u prirodnim uslovima monoinfekcije *O. rhinotracheale* mogle da se očekuju kliničke i patomorfološke promene manjeg intenziteta od promena izazvanih sprovedenim eksperimentom.

Suspenzija *O. rhinotracheale* za eksperimentalnu infekciju, pripremljena je od kolonija izraslih na čvrstoj hranljivoj podlozi iz druge pasaže nabavljene liofilizovane kulture koja je pripremljena iz treće pasaže izvornog izolata iz patološkog materijala (organa obolelih brojlera iz južne Afrike). Kultivisanjem uzročnika na čvrstoj hranljivoj

podlozi i malim brojem pasaža nastojalo se da se u što većoj meri očuva virulentnost uzročnika. Sprenger i saradnici (1998) kao ključne razloge za uspeh eksperimenta izvedenog na ćurkama u pogledu ispoljavanja kliničkih simptoma i nastanka patomorfoloških promena, navode kultivisanje bakterija za eksperimentalnu infekciju na čvrstoj hranljivoj podlozi i mali broj pasaža u *in vitro* uslovima.

Kod inficiranih brojlerskih roditelja nije bilo kliničkih znakova infekcije. Primenom Studentovog t testa nije ustanovljeno da infekcija nepovoljno utiče na prirast, odnosno nije utvrđena statistička značajnost razlike aritmetičkih sredina telesne mase između inficirane i kontrolne grupe 7 dana posle inficiranja. Podaci iz literature o kliničkim simptomima razlikuju se kod eksperimentalno i prirodno inficiranih ptica.

Chin i saradnici (2003) navode da se klinički znaci kod prirodno inficiranih pilića javljaju između treće i šeste nedelje života sa mortalitetom od 2 do 10% i da su od simptoma prisutni: depresija, nazalni iscedak, kijanje, facijalni edem, smanjeno uzimanje hrane i smanjen prirast. Slične manifestacije opisali su van Beek i saradnici (1994) u slučaju pojave infekcije kod brojlera u Holandiji kada su se ispoljili klinički simptomi u vidu kijanja, nazalnog iscetka i lakrimacije. Kod brojlerskih roditelja oboljenje zahvata ptice u periodu nošenja, uglavnom u špicu nosivosti ili neposredno pre pronosjenja. Javlja se neznatno povišenje mortaliteta, smanjeno je uzimanje hrane i prisutni su blagi respiratorni simptomi (Hafez, 1996).

Najupečatljivija manifestacija infekcije kod veštački inficiranih pilića je usporen rast. Međutim, drugi klinički znaci (slabost, dispnoja, mukozni iscedak iz nosa) i uginuća zapaženi kod prirodno inficiranih ptica nisu primećeni kod veštački inficiranih pilića i ćurića (van Empel i saradnici, 1996). Kilic i saradnici (2009) opisali su kliničke simptome u vidu otežanog disanja kod svega 3 od 30 brojlera, inficiranih u uzrastu od 14 nedelja.

Razlike u eksperimentalnoj i prirodnoj infekciji u pogledu ispoljavanja kliničke slike mogle bi da se objasne uticajem nekih od predisponirajućih faktora. U farmskim uslovima značajan uticaj na ispoljavanje kliničkih simptoma mogu da imaju: stres, prenaseljenost, loša ventilacija, prisustvo drugih bakterija i visok nivo amonijaka.

Odsustvo nepovoljnog uticaja veštačke infekcije na prirast kokoši iz inficirane grupe, nasuprot rezultatima za brojlere koje su objavili van Empel i saradnici (1996) može da se objasni manjom osetljivošću kokoši brojlerskih roditelja ili uzrasnom otpornošću. Visoka seroprevalencija jata kokoši brojlerskih roditelja starijih od 20 nedelja (Gavrilović, neobjavljena zapažanja) bez istorije respiratornih simptoma i odstupanja rezultata od tehnoloških normi ide u prilog rezultatima eksperimenta. U

eksperimentu koji smo izveli, čak ni visokom koncentracijom klica direktno aplikovanim intratrahealno nije isprovocirana klinička slika, već je infekcija proticala asimptomatski kao i prirodna infekcija. Ovakvi rezultati podudaraju se sa zaključkom magistarske teze da iako je *O. rhinotracheale* rasprostranjen u intenzivnoj brojlerskoj proizvodnji u Južnobanatskom okrugu, njegovo prisustvo ne mora da dovede do ispoljavanja kliničke slike u vidu poremećaja respiratornog sistema (Gavrilović, 2009). Do sličnih saznanja došli su i Asadpour i saradnici (2008) ispitivanjem prisustva *O. rhinotracheale* u 22 jata brojlerskih roditelja u Iranu. Serološkim ispitivanjem utvrđeno je da su jata bila inficirana ali u vreme uzimanja uzoraka nisu ispoljavala bilo kakve simptome.

U inficiranoj grupi fazana klinički simptomi javili su se samo kod jednog fazana, dva dana posle inficiranja. Zapaženo je sporije kretanje, neveselost, nakostrešenost perja i pokreti glave kao da pokušava da izbací sadržaj iz kljuna. Primenom Studentovog t testa utvrđeno je da postoji statistička značajnost ( $p < 0,05$ ) razlike u telesnoj masi izmerenoj sedam dana posle eksperimentalnog inficiranja, između inficirane i kontrolne grupe fazana što dokazuje da se infekcija nepovoljno odrazila na prirast.

U literaturi ima podataka o infekciji kod pilića i ćurića, ali veoma malo se zna o infekciji kod drugih vrsta ptica. Sprenger i saradnici (1998) opisuju simptome depresije, kašlja i smanjenog uzimanja hrane kod tovnih ćurana iz grupe inficirane I/T čistom kulturom *O. rhinotracheale* i grupe inficirane I/T plućnim homogenizatom koji su nastali 24 h posle inficiranja. Nakon 48 h od inficiranja, nekoliko ćurana iz ove dve grupe, iskašljavalo je krvavu sluz i oni su uginjavali nakon 24 h. Ćurani inficirani I/T čistom kulturom *O. rhinotracheale* i ćurani inficirani I/T plućnim homogenizatom imali su statistički značajan gubitak telesne mase u poređenju sa kontrolnim grupama. Ni jednim drugim opisanim eksperimentom nije izazvana klinička slika u vidu teškog respiratornog distresa. U našim ispitivanjima utvrđen je nepovoljan uticaj infekcije na prirast kod fazana kao u opisanom eksperimentu na ćurkama, ali ne i drugi klinički simptomi. Rezultati koje su dobili Eroksuz i saradnici (2006) ispitivanjem patogenosti uzročnika za japanske prepelice (*Coturnix coturnix japonica*) u eksperimentalnim uslovima su slični našim rezultatima za kokoši i fazane u pogledu ispoljavanja kliničkih simptoma. Ni jedna od 30 ptica, inficiranih aerosolom, nije ispoljila kliničke simptome tokom trajanja eksperimenta.

Nepovoljan uticaj infekcije na telesnu masu fazana i odsustvo kliničkih manifestacija (simptomi su zapaženi samo kod jedne ptice) podudara se sa podacima do

kojih su došli van Empel i saradnici (1996), van Veen i saradnici (2000b) i Kilic i saradnici (2009) ispitivanjem veštačke infekcije kod pilića.

Jedini slučaj klinički ispoljene prirodne infekcije kod divljih ptica opisali su Hafez i Lierz (2010) kod mladih sokolova, u farmskom uzgoju, u vidu respiratornog distresa.

Patoanatomske promene nađene su kod 20% inficiranih kokoši. Manifestovale su se u vidu blage upale gornjih respiratornih puteva: nosnih šupljina, infraorbitalnih sinusa, larinksa i traheje kao i hiperemijom i edemom pluća. Kod većine inficiranih kokoši nije bilo vidljivih promena na respiratornim organima.

Slične promene opisali su Kilic i saradnici (2009) kod veštački inficiranih brojlera u starosti od 14 dana putem aerosola. Kod pet pilića između 7. i 14. dana od inficiranja zapaženo je nakupljanje male količine sluzi u nosu, larinksu i traheji kao i hiperemija sluznice gornjih respiratornih puteva što se podudara sa našim rezultatima patoanatomskog pregleda inficiranih kokoši. Kod pojedinih pilića, navedeni autori opisuju zelenkasto-crvena ognjišta u plućima dok su kod jedne inficirane kokoši u našim ispitivanjima, pluća bila crvena, zaobljenih rubova, čvrste konzistencije što je karakteristično za hiperemiju i edem.

Van Veen i saradnici (2000b) su istraživanjem uticaja veštačke infekcije na različite provenijencije pilića, prouzrokovane aplikacijom uzročnika aerosolom, utvrdili patoanatomske promene u traheji kod komercijalnih brojlera i SPF brojlera nakon inficiranja samo ornitobakterijumom, ali su promene bile izraženije kada su pilići prethodno bili inficirani NDV-om. Ovakav nalaz je u saglasnosti sa našim zapažanjem slabo izraženih makroskopskih promena u gornjim respiratornim putevima kod veštački inficiranih kokoši brojlerskih roditelja.

Makroskopske promene kod inficiranih fazana utvrđene su kod većeg broja ptica i bile su izraženije u odnosu na grupu inficiranih kokoši brojlerskih roditelja. Utvrđene su u nosnim šupljinama, infraorbitalnim sinusima, larinksu, traheji, plućima i vazдушnim kesama. Kod inficiranih fazana sluznica gornjih respiratornih puteva: nosnih šupljina, larinksa i traheje je bila zacrvenjena i prekrivena sluzavim sadržajem koji se nakupljao i u infraorbitalnim sinusima. Pluća većine inficiranih fazana su bila uvećana, crvene boje, zaobljenih rubova, a sa preseka promenjenih pluća isticala je krvavo-penušava tečnost. Na zidovima torakalnih vazдушnih kesa kod dva fazana zapažene su promene u vidu jasno lokalizovanih, žućkastih, okruglih zadebljanja prečnika oko 1-2 mm za razliku od negativnog makroskopskog nalaza u vazдушnim kesama kod kokoši brojlerskih roditelja.

Eroksuz i saradnici (2006) izazvali su slične promene u plućima i traheji veštačkim inficiranjem japanskih prepelica. Makroskopski nalaz odlikovala je blaga hiperemija pluća i traheje i zadebljanje pleure.

Histopatološke promene ustanovljene u respiratornim organima inficiranih kokoši brojerskih roditelja i fazana karakterisao je inflamatorni odgovor tipičan za bakterijsku infekciju. Kod inficiranih fazana bile su učestalije i jačeg intenziteta u odnosu na inficirane kokoši, mada je i kod njih inflamatorni odgovor bio relativno slabo izražen. U respiratornim organima inficiranih kokoši brojerskih roditelja histopatološke promene utvrđene su kod 5 ptica, a učestalost je iznosila 10-40% za pojedine organe. U nosu i sinusima promene su ustanovljene u 10% uzoraka, u larinksu 20%, u traheji 40%, u plućima 50% i u vazдушnim kesama 20% uzoraka.

U lumenu larinksa i traheje inficiranih kokoši bio je prisutan eksudat koji se sastojao iz sluzi, eritrocita i heterofila. U lamini propriji mukoze nalazio se infiltrat od inflamatornih ćelija u kojem su dominirali heterofili, a krvni sudovi su bili hiperemični. U plućima se nalaz karakterisao hiperemijom, a jedna pluća bila su i edematozna. Vazdušne kese kod dva leša bile su zadebljale usled infiltracije mononuklearima.

Histopatološke promene u respiratornim organima inficiranih fazana utvrđene su kod 7 ptica sa učestalošću promena 10-70% u pojedinim organima. Utvrđene su u nosu u 40% uzoraka, sinusima 30%, u larinksu i traheji 50%, u plućima 70% i u vazдушnim kesama 30% uzoraka.

U nosnim šuplinama je zapaženo nakupljanje veće količine sluzavog sadržaja u kojem su se nalazili eritrociti i heterofili. U sinusima se nalazila mala količina sluzi i po neka inflamatorna ćelija, a kod jedne ptice i krvarenja. Histopatološki nalaz u larinksu i traheji većine uzoraka odgovarao je kataralnom zapaljenju. U lumenu se nalazila izvesna količina eksudata. Promene na epitelu manifestovale su se u vidu hiperplazije, degenerativno-nekrotičnih promena i deskvamacije. Krvni sudovi lamine proprije larinksa i traheje bili su injicirani, a ćelijski infiltrat sastojao se iz heterofila, limfocita, monocita i malog broja plazmocita. Slično gornjim respiratornim putevima, u primarnim bronhusima je takođe zabeleženo nakupljanje sluzavog sadržaja sa heterofilima i inflamatorni ćelijski infiltrat u lamini propriji. Kod sedam fazana histopatološki nalaz u plućima karakterisao se hiperemijom. Krvni sudovi pluća bili su prepuni krvi, a u lumenu parabronhija i atrijsa kod dva fazana zapaženo je nakupljanje serozne tečnosti sa malim brojem inflamatornih ćelija. Kod dva fazana razvila se fibrinozna pneumonija koja se može smatrati posledicom intenzivnijeg inflamatornog

procesa, što nije bio slučaj ni kod jedne inficirane kokoši. Granulomi, takođe nisu nađeni u plućima kokoši, a ustanovljeni su u plućima dva inficirana fazana.

Mnogi autori, slično našim zapažanjima, navode da se kod inficiranih ptica javlja heterofilni infiltrat u respiratornim organima (De Rosa i saradnici, 1996; Sprenger i saradnici, 1998; Chin i saradnici, 2003; Kilic i saradnici, 2009). Promene u respiratornim organima kod kokoši brojlerskih roditelja su manjeg intenziteta od promena koje su opisali pojedini autori kod brojlera (van Veen i saradnici, 2000b; Kilic i saradnici, 2009) što se može objasniti različitim uzrastom inficiranih kokoši i različitom osetljivošću različitih generacija hibrida, odnosno različitih provenijencija. Ovakvom zaključku idu u prilog i rezultati do kojih su došli van Veen i saradnici (2000b) istraživanjem eksperimentalne infekcije kod različitih provenijencija pilića teških linija. Promene na vazдушnim kesama i plućima utvrđene su posle inficiranja različitim sojevima *O. rhinotracheale* aerosolom kod SPF brojlera i komercijalnih brojlera, dok kod SPF pilića rase leghorn nisu ustanovljene lezije u plućima, a promene na vazдушnim kesama su bile manje izražene. Kod prirodno inficiranih ptica opisane su mnogo izraženije histopatološke promene nego kod ptica koje su veštački inficirane. De Rosa i saradnici (1996) opisali su promene karakteristične za fibrinozno-gnojnu pneumoniju kod inficiranih ćuraka, a slične manifestacije utvrdili su Gornatti Churria i saradnici (2011) kod brojlera. Razlike u intenzitetu histopatoloških lezija kod veštački inficiranih u odnosu na prirodno inficirane ptice najverovatnije su posledica delovanja drugih činilaca, infektivnih agenasa ili ambijentalnih faktora. Analizom histopatoloških promena u slučajevima prirodne infekcije često se mogu utvrditi i promene koje su karakteristične za virusne infekcije. Tako su, na primer, Odor i saradnici (1997) i Van Veen i saradnici (2000a) opisali mešane infekcije u kojima su pored ornitobakterijuma brojleri bili inficirani NDV-om, odnosno IBV-om. Difuzna limfocitna infiltracija pluća i traheje koju opisuju navedeni autori posledica je odgovora organizma na virusnu infekciju, dok su fibrinozne do fibrinozno gnojne promene posledica delovanja ornitobakterijuma. U našim istraživanjima u plućima dva fazana utvrđen je fibrinozni eksudat. Van Empel i saradnici (1999) utvrdili su granulome u vazдушnim kesama veštački inficiranih pilića NDV-om i ornitobakterijumom dok su u našim ispitivanjima ustanovljeni granulomi u plućima dva fazana inficiranih samo ornitobakterijumom.

*Ornithobacterium rhinotracheale* se teško kultiviše zbog posebnih kulturelnih zahteva i sporog rasta. Kolonije izrastu obično posle 24-48 h u mikroaerofilnoj sredini zbog čega se dešava da ih u rutinskoj dijagnostici prerastu brzo-rastuće bakterije kao što su *E. coli*, *Proteus* ili *Pseudomonas*. Ovo je bio razlog zbog kojeg smo se opredelili da



za izolaciju koristimo i jednu selektivnu hranljivu podlogu sa gentamicinom kako bi se suprimirao rast drugih bakterija.

*Ornithobacterium rhinotracheale* je reizolovan iz respiratornih organa 8 od 10 (80%) inficiranih fazana. Najviše izolata je bilo iz pluća (5), zatim iz infraorbitalnih sinusa (4), larinksa (3), traheje (1), dok iz ostalih unutrašnjih organa uzročnik nije izolovan. *O. rhinotracheale* nije izolovan iz organa inficiranih kokoši brojlerskih roditelja niti iz organa ptica iz kontrolnih grupa. Ovakvi rezultati mogli bi da se objasne različitom prijemčivošću dve ispitivane vrste ptica ili efikasnijim imunološkim mehanizmima usmerenim prema ovom uzročniku kod kokoši brojlerskih roditelja provenijencije „Ross 308“ u poređenju sa fazanima.

Rezultati izolacije uzročnika iz organa inficiranih kokoši u saglasnosti su sa rezultatima do kojih su došli van Empel i saradnici (1999) istraživanjem uticaja uzročnika na tok bolesti veštački inficiranih SPF kokoši rase leghorn, starih 26 dana. *Ornithobacterium rhinotracheale* izolovan je iz traheje inficiranih kokoši dva dana posle veštačkog inficiranja, dok u kasnijem periodu uzročnika više nije bilo moguće izolovati.

Rezultati izolacije kod prirodno inficiranih kokoši brojlerskih roditelja u značajnoj meri se podudaraju sa rezultatima izolacije kod veštački inficiranih kokoši. Negativni rezultati izolacije uzročnika iz organa veštački inficiranih kokoši u saglasnosti su sa rezultatima ispitivanja za 5 jata brojlerskih roditelja u južnom Banatu u starosti od 20 i više nedelja u kojima je utvrđeno prisustvo specifičnih antitela, ali se uzročnik nije mogao izolovati iz organa (Gavrilović, neobjavljeni podaci). Asadpour i saradnici (2008) ispitivali su prisustvo uzročnika u 22 jata brojlerskih roditelja izolacijom, primenom PCR metode i serološkim ispitivanjem specifičnih antitela. Iako su sva ispitana jata bila serološki pozitivna, uzročnik je izolovan iz malog broja uzoraka trahealnih briseva iz samo pet jata. Navedeni podaci o izolaciji uzročnika iz veštački i prirodno inficiranih kokoši navode na zaključak da uzročnik teško opstaje u organizmu kokoši brojlerskih roditelja.

S obzirom da se kod veštački inficiranih brojlera uzročnik može izolovati iz pluća i traheje 30-50% ptica u prve dve nedelje (Kilic i saradnici, 2009), može se pretpostaviti da postoji i rasna predispozicija za prijemčivost *O. rhinotracheale* i nastanak oboljenja. Van Veen i saradnici (2000b) istraživali su patogenost uzročnika za brojlere i posle veštačkog inficiranja ptica utvrdili da su SPF kokoši rase leghorn manje prijemčive na uzročnika u poređenju sa SPF brojlerima i komercijalnim brojlerima.

*Ornithobacterium rhinotracheale* se kod prirodno inficiranih ptica izoluje iz respiratornih organa, obično iz traheje, trahealnih briseva, pluća i vazdušnih kesa. Pokušaji izolacije uzročnika iz ostalih unutrašnjih organa koji se koriste u rutinskoj dijagnostici poput srca, jetre i dr. nisu dali rezultate (Hafez i saradnici, 1993). Međutim, kod veštački inficiranih ptica, intravenskom aplikacijom uzročnika, izolacija je bila moguća i iz ovih organa, pa čak i iz zglobova, mozga, jajnika i jajovoda (van Beek i saradnici, 1994; Back i saradnici, 1998b).

Sprenger i saradnici (1998) navode da je *O. rhinotracheale* kod intratrahealno inficiranih ćuraka izolovan iz pluća (40%), vazdušnih kesa (30%), sinusa, traheje, slezine i bubrega 20% ptica. Ovi podaci upoređeni sa rezultatima do kojih smo došli upućuju na različitu osetljivost različitih vrsta ptica na *O. rhinotracheale*. Izolacija uzročnika iz unutrašnjih organa u opisanom eksperimentu podudara se sa teškom kliničkom slikom i izraženim patomorfološkim promenama u organima. Pored toga postoji i mogućnost različite osetljivosti ptica na uzročnika u različitim uzrastima. Tako na primer, Van Empel i saradnici (1996) navode da je uzročnik izolovan samo iz vazdušnih kesa eksperimentalno inficiranih ćurića starih 31 dan kod kojih nije bilo kliničkih simptoma, a patomorfološke promene su se manifestovale samo na vazdušnim kesama.

Jedan od zadataka ispitivanja bio je praćenje serološkog odgovora. I kod fazana i kod kokoši brojerskih roditelja utvrđene su visoke vrednosti titra specifičnih antitela sedmog dana posle inficiranja. Različite vrednosti titra specifičnih antitela u krvi kokoši i fazana, verovatno su posledica intenzivnijeg imunološkog odgovora kokoši brojerskih roditelja na ovog uzročnika. Više autora, slično našim rezultatima, navodi da se sedmog dana nakon veštačkog inficiranja kod različitih vrsta ptica: ćuraka, kokoši, prepelica mogu da ustanove specifična antitela za uzročnika (Sprenger i saradnici, 1998; Van Empel i saradnici, 1999; Eroksuz i saradnici, 2006). Vrednosti titra utvrđene za kokoši, sedmog dana posle inficiranja, bile su više od vrednosti koje navode Van Empel i saradnici (1999) najverovatnije zbog različitog načina inokulacije i različite koncentracije aplikovanih bakterija. U eksperimentu navedenih autora najviše vrednosti titra specifičnih antitela ustanovljene su 9 dana posle aplikacije suspenzije bakterijske kulture u koncentraciji  $3,8 \times 10^8$  CFU/ml putem aerosola. U našim ispitivanjima, maksimalne vrednosti titra specifičnih antitela kod veštački inficiranih ptica postignute su već sedmog dana što se može objasniti većom koncentracijom suspenzije bakterijske kulture ( $10^{11}$  CFU/ml) i intratrahealnim načinom aplikacije. Antitela kod inficiranih kokoši i fazana mogla su se registrovati do 12 nedelja posle inficiranja dok su vrednosti

sa 14 nedelja bile ispod granice primenjenog testa za proglašavanje uzorka pozitivnim što je u saglasnosti sa rezultatima eksperimenta koji su izveli Van Empel i saradnici (1999). Autori navode niske vrednosti titra specifičnih antitela kod veštački inficiranih pilića, 12 i 14 nedelja posle inficiranja.

Kod prirodno inficiranih ptica vrednosti titra specifičnih antitela spontano opadaju od 6. do 10. nedelje posle inficiranja (Van Empel i saradnici, 1999). Različito vreme perzistencije antitela u krvi prirodno i veštački inficiranih ptica može da se objasni time što je kod veštačke infekcije obezbeđena viša koncentracija bakterija i njihovo efikasnije prodiranje u organizam ptica.

Serološkim ispitivanjem isključen je uticaj virusa atipične kuge živine, virusa infektivnog bronhitisa, virusa avijarne influence, pneumovirusa, *M. synoviae* i *M. gallisepticum* na pojavu patomorfoloških promena u respiratornim organima veštački inficiranih ptica. Vrednosti titra specifičnih antitela protiv virusa atipične kuge i virusa infektivnog bronhitisa u parnim serumima kokoši, kao i vrednosti titra specifičnih antitela protiv virusa atipične kuge u parnim serumima fazana odgovaraju sprovedenoj vakcinaciji protiv ovih bolesti.

## 7. ZAKLJUČCI

1. Kod veštački inficiranih kokoši brojerskih roditelja nije utvrđen nepovoljan uticaj uzročnika na zdravstveno stanje. Eksperimentom je potvrđeno da kod kokoši brojerskih roditelja infekcija *O. rhinotracheale* protiče supklinički i da nema nepovoljan uticaj na prirast.
2. Patoanatomske promene kod veštački inficiranih kokoši brojerskih roditelja manifestovale su se u respiratornim organima u vidu blagog kataralnog zapaljenja gornjih disajnih puteva: nosnih šupljina, larinksa, traheje i hiperemijom pluća kod malog broja inficiranih kokoši.
3. Histopatološke promene kod veštački inficiranih kokoši brojerskih roditelja najčešće su bile zastupljene u plućima (50%), traheji (40%), larinksu (20%), vazdušnim kesama (20%), nosnim šupljinama (10%), infraorbitalnim sinusima (10%). Manifestovale su se u vidu kataralnog zapaljenja gornjih respiratornih organa i hiperemijom pluća. Dominantnu ćelijsku populaciju u inflamatornom infiltratu predstavljali su heterofili.
4. *Ornithobacterium rhinotracheale* soj B3263/91 nije bilo moguće reizolovati iz organa kokoši brojerskih roditelja, komercijalnog hibrida „Ross 308“, sedam do dvanaest dana posle eksperimentalnog inficiranja u starosti od šesnaest nedelja.
5. Veštačka infekcija *O. rhinotracheale* sojem B3263/91 imala je nepovoljan uticaj na prirast fazana.
6. Patoanatomske promene kod veštački inficiranih fazana manifestovale su se u respiratornim organima u vidu kataralnog zapaljenja gornjih disajnih puteva: nosnih šupljina, infraorbitalnih sinusa, larinksa i traheje, kao i hiperemijom pluća i aerosakulitisom.

7. Histopatološke promene kod veštački inficiranih fazana najčešće su otkrivene u plućima (70%), larinksu (50%), traheji (50%), nosnim šupljinama (40%), infraorbitalnim sinusima (30%) i vazdušnim kesama (30%). Promene su se manifestovale u vidu kataralnog zapaljenja gornjih respiratornih puteva, a dominantnu ćelijsku populaciju u inflamatornom infiltratu predstavljali su heterofili.
8. *Ornithobacterium rhinotracheale* soj B3263/91 reizolovan je iz respiratornih organa fazana: infraorbitalnih sinusa, larinksa, traheje i pluća, sedam do dvanaest dana posle veštačkog inficiranja u starosti od dvadeset nedelja. Iz ostalih unutrašnjih organa uzročnik nije izolovan.
9. Serološki odgovor kod veštački inficiranih kokoši brojlerskih roditelja i fazana odlikovao se brzim stvaranjem specifičnih antitela za uzročnika koja su dostigla maksimalan nivo u krvi, u prvoj nedelji posle veštačkog inficiranja. Vrednosti titra antitela su postepeno opadale i održavale se na stabilnom nivou do dvanaeste nedelje od inficiranja, a nakon četrnaest nedelja od inficiranja specifična antitela više se nisu mogla otkriti metodom ELISA.
10. Fazani su se pokazali osetljivijim na veštačku infekciju *O. rhinotracheale* sojem B3263/91 od kokoši brojlerskih roditelja komercijalnog hibrida „Ross 308“.



## 8. SPISAK LITERATURE

1. Abdul-Aziz, T. A., Weber, L. J. 1999. *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in a turkey flock in Ontario. The Canadian Veterinary Journal 40: 349-50.
2. Amonsin, A., Wellehan, J. F. X., Li, L. L., Vandamme, P., Lindeman, C., Edma, M., Robinson, R. A., Kapur, V. 1997. Molecular epidemiology of *Ornithobacterium rhinotracheale*. Journal of Clinical Microbiology 35: 2894-2898.
3. Asadpour, Y., Bozorgmehrifard, M. H., Pourbakhsh, S. A., Banani, M., Charkhkar, S. 2008. Isolation and identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* in broiler breeder flocks of Guilan Province, north of Iran. Pakistan Journal of Biological Sciences 11: 1487-1491
4. Back, A., Gireesh, R., Halvorson, D., Nagaraja, K. 1997. Experimental studies of *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) infection. In: Proceedings of the 46<sup>th</sup> Western Poultry Disease Conference, Sacramento, California, USA, 7-8.
5. Back, A., Halvorson, D., Rajashekara, G., Nagaraja, K. V. 1998a. Development of a serum plate agglutination test to detect antibodies to *Ornithobacterium rhinotracheale*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 10: 84-86.
6. Back, A., Rajashekara, G., Jeremiah, R., Halvorson, D., Nagaraja, K. 1998b. Tissue distribution of *Ornithobacterium rhinotracheale* in experimentally infected turkeys. Veterinary Record 143: 52-53.
7. Ballagi, A., Holmquist, G., Odmark, M., Leathers, V. L. 2000. ELISA test for the detection of *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in chickens and turkeys. In: Proceedings of the 49<sup>th</sup> Western Poultry Disease Conference, Sacramento, California, USA, 50-51.
8. Bisschop, S. P. R., van Vuuren, M., Gummow, B. 2004. The use of a bacterin vaccine in broiler breeders for the control of *Ornithobacterium rhinotracheale* in commercial broilers. Journal of the South African Veterinary Association 75: 125-128.
9. Bock, R., Freidlin, P., Manoim, M., Inbar, A., Frommer, A., Vandamme, P., Wilding, P. 1997. *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) associated with a new turkey respiratory tract infectious agent in Israel. In: Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Congress of the World Veterinary Poultry Association, Budapest, Hungary, 120.

10. Bock, R. R., Freidlin, P. J., Tomer, S., Manoim, M., Inbar, A., Frommer, A., Vandamme, P., Wilding, P., Hickson, D. 1995. *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) associated with a new turkey respiratory tract infectious agent. In: Proceedings of the 33<sup>rd</sup> Annual Convention of the Israel Branch of the World Poultry Science Association (WPSA), Israel, 43-45.
11. Bragg, R., Greyling, J., Verschoor, J. 1997. Isolation and identification of NAD-independent bacteria from chickens with symptoms of infectious coryza. *Avian Pathology* 26: 595-606.
12. Canal, C. W., Leao, J. A., Ferreira, D. J., Macagnan, M., Salle, C. T. P., Back, A. 2003. Prevalence of antibodies against *Ornithobacterium rhinotracheale* in broilers and breeders in Southern Brazil. *Avian Diseases* 47: 731-737
13. Chansiripornchai, N. 2004. Molecular interaction of *Ornithobacterium rhinotracheale* with eukaryotic cells. PhD thesis. University of Utrecht.
14. Chansiripornchai, N., Wanasawaeng, W., Sasipreeyajan, J. 2007. Seroprevalence and identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* from broiler and broiler breeder flocks in Thailand. *Avian Diseases* 51: 777-780.
15. Charlton, B. R. 1999. *Bordetella avium* and *Ornithobacterium rhinotracheale* from California poultry submissions. In: Proceedings of the 48<sup>th</sup> Western Poultry Disease Conference, Vancouver, Canada, 80.
16. Charlton, B. R., Channing-Santiago, S. E., Bickford, A. A., Cardona, C. J., Chin, R. P., Cooper, G. L., Droual, R., Jeffrey, J. S., Meteyer, C. U., Shivaprasad, H. L., Walker, R. L. 1993. Preliminary characterization of a pleomorphic gram-negative rod associated with avian respiratory disease. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 5: 47-51.
17. Chin, R., Droual, R. 1997. *Ornithobacterium rhinotracheale* infection. In Calnek B. W. (Ed.), *Diseases of Poultry* (10<sup>th</sup> edn, pp. 1012-1015). Ames: Iowa State University Press.
18. Chin, R. P., van Empel, C. M. P., Hafez, H. M. 2003. *Ornithobacterium rhinotracheale* infection. In Saif, Y. M. (Ed.), *Diseases of Poultry* (11<sup>th</sup> edn, pp. 683-690). Ames: Iowa State University Press.
19. De Rosa, M., Droual, R., Chin, R. P., Shivaprasad, H. L. 1997. Interaction of *Ornithobacterium rhinotracheale* and *Bordetella avium* in turkey poults. In: Proceedings of the 46<sup>th</sup> Western Poultry Disease Conference, Davis, California, USA, 52-53.

20. De Rosa, M., Droual, R., Chin, R. P., Shivaprasad, H. L., Walker, R. L. 1996. *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in turkey breeders. Avian Diseases 40: 865-874.
21. Devriese, L. A., Hommez J., Vandamme P., Kersters, K., Haesebrouck, F. 1995. In vitro antibiotic sensitivity of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains from poultry and wild birds. Veterinary Record 137: 435-436.
22. Droual, R., Chin, R. 1997. Interaction of *Ornithobacterium rhinotracheale* and *Escherichia coli* O78, H9 when inoculated into the air sac in turkey poults. In: Proceedings of the 46<sup>th</sup> Western Poultry Disease Conference, Sacramento, California, USA, 11.
23. Dudouyt, J., Léorat, J., van Empel, P., Gardin, Y., Céline, D. 1995. Isolement d' un nouvel pathogene chez la dinde: *Ornithobacterium rhinotracheale*; Conduite a tenir. In: Proceedings of the Journées de la Recherche Avicole, Angers, France, 240-243.
24. El-Gohary, A., Awaad, M. H. H. 1998. Concomitant *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) and *E. coli* infection in chicken broilers. Veterinary Medical Journal Giza 46: 67-75.
25. El-Gohary, A. 1998. *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) associated with hatching problems in chicken and turkey eggs. Veterinary Medical Journal Giza 46: 183-191.
26. Erbeck, D. H., McMurray, B. L. 1998. Isolation of Georgia variant (Georgia isolate 1992) infectious bronchitis virus but not *Ornithobacterium rhinotracheale* from a Kentucky broiler complex. Avian Diseases 42: 613-617.
27. Eroksuz, H., Ozbey, G., Cevik, A., Gencer Tarakci, B., Balik, D. T. 2006. Immuno-histochemical, pathological, enzyme linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction analysis of experimental *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in quails (*Coturnix coturnix japonica*). Revue de Médecine Vétérinaire 157: 197-202.
28. Euzéby J. P. 1997. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. International Journal of Systematic Bacteriology 47: 590-592. (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Last full update: March 04, 2012. URL: <http://www.bacterio.net>).
29. Franz, G., Hein R., Bricker, J., Walls, P., Odor, E., Salem, M., Sample, B. 1997. Experimental studies in broilers with a Delmarva *Ornithobacterium rhinotracheale* isolate. In Proceedings of the 46<sup>th</sup> Western Poultry Disease Conference, Sacramento, California, USA, 46-48.

30. Gavrilović, P. 2009. Ispitivanje prisustva *Ornithobacterium rhinotracheale* i patomorfoloških promena u respiratornim organima brojlera u intenzivnoj brojlerskoj proizvodnji. Magistarska teza. Univerzitet u Beogradu.
31. Goovaerts, D., Vrijenhoek, M., van Empel, P. 1998. Immuno-histochemical and bacteriological investigation of the pathogenesis of *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in South Africa in chickens with osteitis and encephalitis syndrome. In: Proceedings of the 16<sup>th</sup> European Society of Veterinary Pathology, Lillehammer, Norway, 81.
32. Goovaerts, D., Vrijenhoek, M., van Empel, P. 1999. Immuno-histochemical and bacteriological investigation of the pathogenesis of *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in chickens with osteitis and encephalitis syndrome. In: Proceedings of the 48<sup>th</sup> Western Poultry Disease Conference, Vancouver, Canada, 79.
33. Gornatti Churria, C. D., Sansalone, P. L., Vigo, G. B., Sguazza, G. H., Machuca, M. A., Origlia, J. A., Piscopo, M. V., Herrero Loyola, M. A., Petruccelli, M. A. 2011. Pneumonia in Broiler Chicken Flocks Associated with  $\beta$ -Hemolytic *Ornithobacterium rhinotracheale* Infection. Brazilian Journal of Veterinary Pathology 4: 243-246.
34. Günther, R., Ryll, M., Hinz, K. H., Hafez, H. M. 2002. New variety of *Ornithobacterium rhinotracheale*. In: Proceedings of the 4<sup>th</sup> international symposium on turkey diseases, Berlin, Germany, 63.
35. Hafez, H. M. 1996. Current status on the role of *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) in respiratory disease complexes in poultry. Archiv für Geflügelkunde 60: 208-211.
36. Hafez, H. M. 1997. *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT). In Hafez H. M. and Jodars S. (Eds), Putenkrankheiten (pp. 62-66). Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
37. Hafez, H. M. 1998a. Current status on the Laboratory diagnosis of *Ornithobacterium rhinotracheale* „ORT“ in poultry. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 111: 143-145.
38. Hafez, H. M. 1998b. Respiratory diseases in turkey: Serological surveillance for antibodies against *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) and Turkey rhinotracheitis (TRT). In: Proceedings of the 1<sup>th</sup> International Symposium on Turkey Diseases, Berlin, Germany, 138-145.
39. Hafez, H. M. 2002. Diagnosis of *Ornithobacterium rhinotracheale*. International Journal of Poultry Science 1: 114-118.
40. Hafez, H. M., Beyer, W. 1997. Preliminary investigation on *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) isolates using PCR-fingerprints. In: Proceedings of the 11<sup>th</sup>

International Congress of the World Veterinary Poultry Association, Budapest, Hungary, 51.

41. Hafez, H. M., Kruse, W., Emele, J., Sting, R. 1993. Eine Atemwegsinfektion bei Mastputen durch *Pasteurella*-ähnliche Erreger: Klinik, Diagnostik und Therapie. In: Proceedings of the International Conference on Poultry Diseases, Potsdam, Germany, 105-112.

42. Hafez, H. M., Lierz, M. 2010. *Ornithobacterium rhinotracheale* in nestling falcons. Avian diseases 54: 161-163

43. Hafez, H. M., Mazaheri, A., Sting, R. 2000. Efficacy of ELISA for detection of antibodies against several *Ornithobacterium rhinotracheale* serotypes. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 107: 142-143.

44. Hafez, H. M., Schulze, D. 1998. Efficacy of clinical disinfectants on *Ornithobacterium rhinotracheale* in vitro: Short communication. In: Proceedings of the 1<sup>st</sup> International Symposium on Turkey Diseases, Berlin, Germany, 146-150.

45. Hafez, H. M., Sting, R. 1996. Serological surveillance on *Ornithobacterium rhinotracheale* „ORT“ in poultry flocks using self-made ELISA. In: Proceedings of the 45<sup>th</sup> Western Poultry Disease Conference, Cancun, Mexico, 163-164.

46. Hafez, H. M., Sting, R. 1999. Investigations on different *Ornithobacterium rhinotracheale* „ORT“ isolates. Avian Diseases 43: 1-7.

47. Hinz, K. H., Blome, C., Ryll, M. 1994. Acute exudative pneumonia and airsacculitis associated with *Ornithobacterium rhinotracheale* in turkeys. Veterinary Record 135: 233-234.

48. Hinz, K. H., Hafez, H. M. 1997. The early history of *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT). Archiv für Geflügelkunde 61: 95-96.

49. Hung, A. L., Alvarado, A. 2001. Phynotypic and molecular characterization of isolates of *Ornithobacterium rhinotracheale* from Peru. Avian Diseases 45: 999-1005.

50. Joubert, P., Higgins, R., Laperle, A., Mikaelian, I., Venne, D., Silim, A. 1999. Isolation of *Ornithobacterium rhinotracheale* from turkeys in Quebec, Canada. Avian Diseases 43: 622-626.

51. Kilic, A., Timurkaan, N., Ertas, Yilmaz, F. 2009. Pathological examination and bacterial reisolation by culture and PCR of experimental *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in broiler chickens. Revue de Médecine Vétérinaire 160: 140-144.

52. Leroy-Sétrin, S., Flaujac, G., Thénaisy, K., Chaslus-Dancla, E. 1998. Genetic diversity of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains isolated from poultry in France. *Letters in Applied Microbiology* 26: 189-193.
53. Mouahid, M., Engelhard, E., Grebe, M., Kroppenstedt, M., Mutters, R., Mannheim, W. 1992. Characterization of nonpigmented members of the *Flavobacterium/Cytophaga* complex parasitizing in mammals and birds. In: *Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Symposium on Flavobacterium-Cytophaga and related bacteria*, Bloemfontein, South Africa, 26-36.
54. Nagaraja, K., Back, A., Sorenger, S., Rajashekara, G., Halvorson, D. 1998. Tissue distribution post-infection and antimicrobial sensitivity of *Ornithobacterium rhinotracheale*. In: *Proceedings of the 47<sup>th</sup> Western Poultry Disease Conference*, Sacramento, California, USA, 57-60.
55. Odor, E. M., Salem, M., Pope, C. R., Sample, B., Primm, M., Vance K., Murphy, M. 1997. Isolation and identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* from commercial broiler flocks on the Delmarva Peninsula. *Avian Diseases* 41: 257-260.
56. Popp, C., Hafez, H. M. 2001. *Ornithobacterium rhinotracheale*: Comparison between serotypes and puls gel electrophoresis master isolates of different sources and origin. In: *Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Congress of the World Veterinary Poultry Association*, Cairo, Egypt, 269.
57. Popp, C., Hafez, H. M. 2002. Investigations on *Ornithobacterium rhinotracheale*. In: *Proceedings of the 4<sup>th</sup> international symposium on turkey diseases*, Berlin, Germany, 245-252.
58. Post, K., Murphy, S., Boyette, J., Resseguie, P. 1997. Evaluation of the rapid NF plus system for the identification of *Ornithobacterium rhinotracheale*. In: *Proceedings of the 40<sup>th</sup> Annual meeting of the American Association of Veterinary Diagnosticians*, Louisville, Kentucky, USA, 88.
59. Post, K., Murphy, S., Boyette, J., Resseguie, P. 1999. Evaluation of a commercial system for the identification of *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 11: 97-99.
60. Rahimi, M., Banani, M. 2007. Isolation of *Ornithobacterium rhinotracheale* from the chickens of a broiler farm in Kermanshah province, west of Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research* 8: 355-359.
61. Roepke, D. C., Back, A., Shaw, D. P., Nagaraja, K. V., Sprenger, S. J., Halvorson, D. A. 1998. Isolation and identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* from commercial turkey flocks in the upper Midwest. *Avian Diseases* 42: 219-221.



62. Roger, M. F., Léorat, J. 1997. À l'origine de troubles respiratoires chez la dinde: *Ornithobacterium rhinotracheale* est mieux maîtrisé. Filières Avicoles Juin 1997, 62-63.
63. Ryll, M., Hinz, K. H., Neumann, U., Löhren, U., Sudbeck, M., Steinhagen, D. 1997. Pilot study on prevalence of the *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in meat-type chickens in Northwest Germany. Berliner und Muenchener Tierärztlichen Wochenschrift 110: 267-271.
64. Ryll, M., Hinz, K. H., Salisch, H., Kruse, W. 1996. Pathogenicity of *Ornithobacterium rhinotracheale* for turkey poults under experimental conditions. Veterinary Record 139: 19.
65. Sakai, E., Tokuyama, Y., Nonaka, F., Ohishi, S., Ishikawa, Y., Tanaka, M., Taneno, A. 2000. *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in Japan: preliminary investigations. Veterinary Record 146: 502-503.
66. Salem, M., Odor E. M., Sample, B., Murphy, M., Franz, G. 1997. *Ornithobacterium rhinotracheale*, update and field survey in the Delmarva Peninsula. In: Proceedings of the 46<sup>th</sup> Western Poultry Disease Conference, Sacramento, California, USA, 59-60.
67. Schleifer, J. 1997. IBD and ORT highlight 1997 Western Poultry Disease Meet. Poultry Digest, June 1997: 28-30
68. Sprenger, S. J., Back, A., Shaw, D. P., Nagaraja, K. V., Roepke, D. C., Halvorson, D. A. 1998. *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in turkeys: Experimental reproduction of the disease. Avian Diseases 42: 154-161.
69. Sprenger, S. J., Halvorson, D. A., Nagaraja, K. V., Spasojevic, R., Dutton, R. S., Shaw, D. P. 2000. *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in commercial laying-type chickens. Avian Diseases 44: 725-729.
70. Szalay, D., Glávits, R., Nemes, C., Kósa, A., Fodor, L. 2002. Clinical signs and mortality caused by *Ornithobacterium rhinotracheale* in turkey flocks. Acta Veterinaria Hungarica 50: 297-305.
71. Tabatabai, L. B., Zimmerli, M. K., Zehr, E. S., Briggs, R. E., Tatum, F. M. 2010. *Ornithobacterium rhinotracheale* North American field isolates express a hemolysin-like protein. Avian Diseases 54: 994-1001.
72. Tanyi, J., Bistyak A., Kaszanyitzky, E., Vetesi, F., Dobos-Kovacs M. 1995. Isolation of *Ornithobacterium rhinotracheale* from chickens, hens and turkeys showing respiratory symptoms. Preliminary report. Magyar Allatorvosok Lapja 50: 328-330.
73. Travers, A. F. 1996. Concomitant *Ornithobacterium rhinotracheale* and Newcastle disease infection in broilers in South Africa. Avian Diseases 40: 488-490.

74. Travers, A. F., Coetzee L., Gummow B. 1996. Pathogenicity differences between South African isolates of *Ornithobacterium rhinotracheale*. Onderstepoort Journal of Veterinary Research 63: 197-207.
75. van den Bosch, G. 2001. *Ornithobacterium rhinotracheale*: the current status. In: Proceedings of the 24<sup>th</sup> Technical Turkey Conference, Leyburn, England, 1.
76. van Beek, P. 1994. *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT), clinical aspects in broilers and turkeys. Annual Meeting of the Veterinary Study Group of the EU, Amsterdam, The Netherlands, November 1994.
77. van Beek, P. N. G. M., van Empel, P. C. M., van den Bosch, G., Storm, P. K., Bongers, J. H., Du Preez, J. H. 1994. Ademhalingsproblemen, groeivertraging en gewrichtsontsteking bij kalkoenen en vleeskuikens door een *Pasteurella*-achtige bacterie: *Ornithobacterium rhinotracheale* or „Taxon 28“. Tijdschrift voor Diergeneeskunde 119: 99-101.
78. van Empel, P. 1997. *Ornithobacterium rhinotracheale*: An update. In: Proceedings of Fachgruppe „Geflügelkrankheiten“ der Deutsche Veterinärmedizinischen Gesellschaft and German branch of the World's Veterinary Poultry Association, 52<sup>nd</sup> Semi-annual Meeting on Poultry Diseases, Hannover, Germany, 418-421.
79. van Empel, P. 1998a. *Ornithobacterium rhinotracheale*. PhD Thesis. University of Utrecht.
80. van Empel, P. 1998b. *Ornithobacterium rhinotracheale*: Current status and control. In: Proceedings of the 1<sup>st</sup> International Symposium on Turkey Diseases, Berlin, Germany, 129-137.
81. van Empel, P., van den Bosch, H. 1998. Vaccination of chickens against *Ornithobacterium rhinotracheale* infection. Avian Diseases 42: 572-578.
82. van Empel, P., van den Bosch, H., Goovaerts, D., Storm, P. 1996. Experimental infection in turkeys and chickens with *Ornithobacterium rhinotracheale*. Avian Diseases 40: 858-864.
83. van Empel, P., van den Bosch H., Loeffen P., Storm P. 1997. Identification and serotyping of *Ornithobacterium rhinotracheale*. Journal of Clinical Microbiology 35: 418-421.
84. van Empel, P., Vrijenhoek M., Goovaerts D., van den Bosch, H. 1999. Immunohistochemical and serological investigation of experimental *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in chickens. Avian Pathology 28: 187-193.
85. van Empel, P. C. M., Hafez, H. M. 1999. *Ornithobacterium rhinotracheale*: A review. Avian Pathology 28: 217-227.

86. van Veen, L., Gruys E., Frik, K., van Empel, P. 2000. Increased condemnation of broilers associated with *Ornithobacterium rhinotracheale*. Veterinary Record 147: 422-423.
87. van Veen, L., van Empel, P., Fabri T. 2000. *Ornithobacterium rhinotracheale*, a primary pathogen in broilers. Avian Diseases 44: 896-900.
88. Vandamme, P., Segers, P., Vancanneyt, M., van Hove, K., Mutters, R., Hommez, J., Dewhirst, F., Paster, B., Kersters, K., Falsen, E., Devrieze, L., Bisgaard, M., Hinz, K. H., Mannheim, W. 1994. Description of *Ornithobacterium rhinotracheale* gen. nov. sp. nov. isolated from the avian respiratory tract. International Journal of Systematic Bacteriology 44: 24-37.
89. Zorman-Rojs, O. 2000. Countryreports - Slovenia *Ornithobacterium rhinotracheale* Newsletter of the World Veterinary Poultry Association. In:  
[http://www.wvpa.net/newsletter/reports\\_slovenia.html](http://www.wvpa.net/newsletter/reports_slovenia.html). (01.02.2006)
90. Zorman-Rojs, O., Adovc, I., Bencina, D., Mrzel, I. 2000. Infection of turkeys with *Ornithobacterium rhinotracheale* and *Mycoplasma synoviae*. Avian Diseases 44: 1017-1022.

## Biografija

Pavle D. Gavrilović, rođen je 11.10.1976. godine u Pančevu. U rodnom gradu završio je osnovnu školu i gimnaziju prirodnomatematičkog smera, a prvu godinu studija na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu upisao je 1995. godine. Diplomirao je u julu 2003. godine sa prosečnom ocenom 9,00. Po odsluženju vojnog roka, juna 2004. godine zapošljava se kao veterinar pripravnik u Veterinarskom specijalističkom institutu „Pančevo“, a od novembra 2008. godine raspoređen je na radno mesto rukovodioca odeljenja za patologiju i kliničku parazitologiju. Postdiplomske studije, odsek magistratura, naučna oblast patologija i terapija životinja upisao je 2004. godine i završio ih sa prosečnom ocenom 9,70. Magistarsku tezu pod naslovom „Ispitivanje prisustva *Ornithobacterium rhinotracheale* i patomorfoloških promena u respiratornim organima brojlera u intenzivnoj brojlerskoj proizvodnji“ odbranio je marta 2009. godine. Odlukom Naučnog veća Naučnog instituta za veterinarstvo Srbije od 21.02.2011.godine, izabran je u istraživačko zvanje istraživač saradnik. Bio je autor i nosilac dva projekta Ministarstva poljoprivrede iz oblasti „Unapređenje nadzora i kontrole zaraznih bolesti životinja i zoonoza“, a učestvovao je u realizaciji još četiri projekta iz navedene oblasti. Učestvovao je na domaćim i međunarodnim veterinarskim simpozijumima na kojima je prezentovao radove i objavio devet stručnih i naučnih radova. Kao prvi autor objavio je jedan rad u međunarodnom veterinarskom časopisu, a po jedan rad prihvaćen je za objavljivanje u medicinskom i veterinarskom međunarodnom časopisu.

**Prilog 1.**

**Izjava o autorstvu**

Potpisani Pavle Gavrilović

Broj upisa: \_\_\_\_\_

**Izjavljujem**

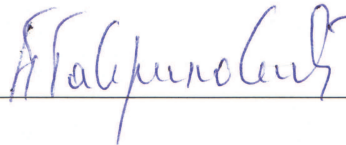
da je doktorska disertacija pod naslovom

Ispitivanje uticaja *Ornithobacterium rhinotracheale* na pojavu patomorfoloških promena u respiratornim organima brojlerskih roditelja i fazana nakon veštačke infekcije

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 04.02.2013.g.

  
\_\_\_\_\_

Prilog 2.

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i Prezime autora: Pavle Gavrilović

Broj upisa: \_\_\_\_\_

Studijski program: Doktorske akademske studije

Naslov rada: Ispitivanje uticaja *Ornithobacterium rhinotracheale* na pojavu patomorfoloških promena u respiratornim organima brojlerskih roditelja i fazana nakon veštačke infekcije

Mentor: Prof. dr Milijan Jovanović

**Potpisani Pavle Gavrilović**

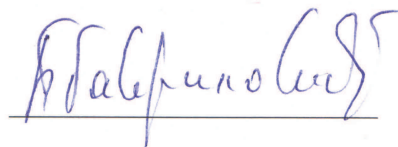
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 04.02.2013.g.





### Prilog 3.

## Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Ispitivanje uticaja *Ornithobacterium rhinotracheale* na pojavu patomorfoloških promena u respiratornim organima brojerskih roditelja i fazana nakon veštačke infekcije

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

1. Autorstvo

☒ 2. Autorstvo - nekomercijalno

3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerade

4. Autorstvo - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima

5. Autorstvo - bez prerade

6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima

U Beogradu, 04.02.2013.g.

Potpis doktoranda

