

**УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ  
ФАКУЛТЕТ ВЕТЕРИНАРСКЕ МЕДИЦИНЕ  
КАТЕДРА ЗА БОЛЕСТИ КОПИТАРА, МЕСОЈЕДА,  
ЖИВИНЕ И ДИВЉАЧИ**

**ИСПИТИВАЊЕ УТИЦАЈА ПРОБИОТИКА И ПРЕБИОТИКА  
НА ПОСТВАКЦИНАЛНИ ОДГОВОР БРОЈЛЕРСКИХ  
ПИЛИЋА ПОСЛЕ ПЕРОРАЛНЕ ВАКЦИНАЦИЈЕ  
АТЕНУИРАНИМ СОЈЕМ *SALMONELLA ENTERITIDIS***

**Магистарска теза**

**Бојан Голић, дипломирани ветеринар**

**Београд, 2010. година**

**Комисија за оцену и одбрану магистарске тезе:**

- 1. ментор: Др Радмила Ресановић, ванредни професор,**  
Факултет ветеринарске медицине, Београд
- 2. члан: Др Тодор Палић, редовни професор,**  
Факултет ветеринарске медицине, Београд
- 3. члан: Др Дејан Крњајић, доцент,**  
Факултет ветеринарске медицине, Београд
- 4. члан: Др Миленко Жутић, научни сарадник**  
Научни институт за ветеринарство Србије, Београд

*Овим путем желим да се захвалим свима онима, који су ми, на било који начин помогли у изради магистарске тезе.*

*Захваљујем се проф. др Радмили Ресановић, која ми је, као ментор, помагала током постдипломских студија и израде магистарске тезе.*

*Ветеринарском институту Републике Српске „Др Васо Бутозан“ Бања Лука, захваљујем се на свесрдној помоћи и разумијевању.*

*На указаној подршци, помоћи и стрпљењу, захваљујем се мојој породици, мајци Мирјани, оцу Милану, сестри Невени и баки Зори.*

*На разне начине, помоћ су указали предузеће „Живанић ДС“, Дарио Богдановић, Александра Митровић, Милан Ђирковић, Наташа Килибарда и проф. др Никола Мићић, којима се неизмјерно захваљујем.*

*Посебно се захваљујем Саики Јовановић.*

*ХВАЛА!*

*Аутор*

*Експериментални дио магистарске тезе изведен је на локалитету села Козинци, општина Градишка, Република Српска.*

*Лабораторијска испитивања обављена су у Ветеринарском институту Републике Српске „Др Васо Бутозан“ Бања Лука.*

*Пилићи и храна за пилиће кориштени у огледу, добијени су од предузећа „Живанић ДС“, Горњи Смиртићи, општина Прњавор, Република Српска.*

## ИСПИТИВАЊЕ УТИЦАЈА ПРОБИОТИКА И ПРЕБИОТИКА НА ПОСТВАКЦИНАЛНИ ОДГОВОР БРОЈЛЕРСКИХ ПИЛИЋА ПОСЛЕ ПЕРОРАЛНЕ ВАКЦИНАЦИЈЕ АТЕНУИРАНИМ СОЈЕМ *SALMONELLA* ENTERITIDIS

### КРАТАК САДРЖАЈ

Инфекције животиња и људи салмонелама, заузимају значајно место у ветеринарској и хуманој медицини. Салмонелоза код људи најчешће се јавља као последица конзумирања хране контаминиране патогеним врстама салмонела. Један од најчешћих узрочника салмонелозе животиња и људи је *Salmonella* Enteritidis. Вакцинација против салмонелозе у живинарској производњи Републике Српске, с обзиром на велику цену коштања производње, ризик од појаве и губитке који могу да настану, примењује се код већине родитељских јата, првенствено тешке линије, због њихове веће заступљености, мање код родитељских јата лаке линије и конзумних кока носиља, док се у производњи товних пилића уопште не примењује. Углавном се користе мртве, инактивисане вакцине, а мање живе, атенуиране. Употреба пробиотика и пребиотика, имајући у виду њихов утицај на здравље животиња и производне резултате, представља један од безбеднијих и економичнијих начина у живинарској производњи. Сматра се да пробиотици делују на начин сличан дејству нормалне микрофлоре дигестивног тракта, неутрализацијом токсина, конкуренцијом за адхезивна места, изазивањем поремећаја метаболизма других бактерија, супресијом раста микрофлоре или стимулацијом имунитета, док пребиотици имају улогу у стимулацији имуног одговора, спречавању колонизације црева патогеним бактеријама, улогу хранљивих састојака за епителне ћелије црева и антитуморозна својства.

С обзиром да у доступној литератури нема података о могућности истовременог кориштења пробиотика/пребиотика Biomin® Poultry5Star или пребиотика Bio – Mos™ Alltech® са живом атенуираном вакцином против салмонелозе, а да произвођачи живине, поред све већег интересовања за употребу пробиотика и пребиотика у исхрани живине, показују и интерес за применом вакцина против салмонелозе, очекујемо да би добијени резултати испитивања могли бити од користи у давању одговора на ово питање. Циљ испитивања је да се утврди да ли ће истовремена употреба пробиотика или пребиотика уз вакцинацију товних пилића против *Salmonella* Enteritidis живом атенуираном вакцином, која се примењује првог дана живота, поништити или умањити дејство вакцине на имунски систем пилића и спречити или смањити развој имунитета на салмонелу, обзиром да пробиотик и пребиотик делују негативно на патогене бактерије присутне у цревима пилића, а тако и на *Salmonella* Enteritidis, тј. да ли ће пробиотик или пребиотик препознати живу атенуирану *Salmonella* Enteritidis као вакциналну или као патогену.

Обављено је бактериолошко испитивање клоакалних брисева и различитих органа пилића (слезина, јетра и цекум), применом директне и индиректне методе изолације и серолошко испитивање крвних серума пилића, конкуритивним ELISA тестом произвођача IDEXX Laboratories (*Salmonella* Enteritidis Antibody Test Kit, Flock Check).

Истовремена употреба пробиотика или пребиотика уз вакцинацију товних пилића против *Salmonella* Enteritidis живом атенуираном вакцином првог дана живота, није поништила или умањила дејство вакцине на имунски систем пилића и спречила или смањила развој имунитета на салмонелу.

**Кључне речи:** пребиотик, пробиотик, вакцинација, *Salmonella* Enteritidis.

## TESTING THE INFLUENCE OF PROBIOTIC AND PREBIOTIC ON THE POST – VACCINATED BROILER’S CHICKENS AFTER VACCINATION HAS DONE ORALLY WITH ATTENUATED STRAIN OF *SALMONELLA* ENTERITIDIS

### SUMMARY

Infections caused by *Salmonella* in animals and humans have the great importance in veterinary and human medicine. *Salmonella* in humans usually occurs as a result of consuming a food contaminated with pathogenic types of *Salmonella*. One of the most common salmonella cause in animals and humans is *Salmonella* Enteritidis. Vaccination against salmonella at poultry production in the Republic of Srpska, given the high production costs and the risks of losses that may arise, is applied in most parental clusters, primarily heavy lines, due to they greater exploitation, less applied at light clusters lines and egg – laying hens, while in the production of fattened chickens vaccination do not apply. In used are mainly dead inactivated vaccines and less live attenuated. Use of probiotics and prebiotics, bearing in mind their impact on animal health and production results, is the safest and economically justified ways in poultry production. It is believed that probiotics act in a manner similar to the effect of normal micro flora of the digestive tract, toxin neutralisation, fighting for adhesion sites, causing metabolism disorder in other bacteria, suppression of growth of micro flora and immune system stimulation, while prebiotics have a role in stimulation of the immune response, preventing colonisation of intestinal pathogenic bacteria and the role of nutrients for the intestinal epithelial cells and anti – carcinogenic aspects.

Considering the fact that available literature do not contain necessary information on the possibility of simultaneous use of probiotics/prebiotics BIOMIN® Poultry5Star or prebiotics Bio – Mos™ Alltech® with live attenuated vaccine against salmonella, the poultry producers, in addition to growing interest for use of probiotics and prebiotics in poultry nutrition, showing an interest in using the vaccine against salmonella. We expect that the obtained test results could be useful in gathering necessary information and fulfilling our knowledge on aforementioned subject. The aim of this research is to determine whether the simultaneous use of probiotics or prebiotics within fattened chickens together and vaccination against *Salmonella* Enteritidis with live attenuated vaccine, which is applied from the first day of life, annul or reduce the effect of vaccines on the chickens immune system and prevent or reduce the development of immunity to *Salmonella*, as used probiotic and prebiotic act negatively on the pathogenic bacteria present in the intestines of chickens and also on *Salmonella* Enteritidis, whether used probiotic or prebiotic will indentified attenuated live *Salmonella* Enteritidis as vaccine or as pathogen.

The bacteriological testing on fecal samples and on different chicken organs was carried out (spleen, liver and appendix) using direct and indirect methods of isolation and serological testing of chickens blood serum, competitive ELISA manufactured by IDEXX Laboratories (*Salmonella* Enteritidis Antibody Test Kit, Flock Check).

At the same time the use of probiotics or prebiotics with vaccination of fattening chickens against *Salmonella* Enteritidis with live attenuated vaccine from the first day of life, is not overturned or reduced the effect of vaccines on the immune system of the chickens and prevent or reduce the development of immunity to *Salmonella*.

**Keywords:** prebiotic, probiotic, vaccination, *Salmonella* Enteritidis.

**САДРЖАЈ:**

1. УВОД .....	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ .....	3
3. ЦИЉ И ЗАДАЦИ ИСПИТИВАЊА .....	30
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ .....	31
5. РЕЗУЛТАТИ ИСПИТИВАЊА .....	39
6. ДИСКУСИЈА .....	55
7. ЗАКЉУЧЦИ .....	62
8. ЛИТЕРАТУРА .....	63

## 1. УВОД

Живинарској производњи придаје се све већи значај, како са становишта производње меса и јаја, тако и са становишта контроле и превенције заразних болести које угрожавају живинарску производњу и здравље животиња и људи. Живинарска производња заузима знатан удио у укупној сточарској производњи.

Предност живинарске производње је у бржој и јефтинијој производњи у односу на друге врсте животиња (говеда, свиње), а самим тим и у нижој цени живинског меса, широкој распрострањености потрошње (са религиозног и културног становишта) и са здравственог аспекта исхране људи (низак проценат масти а висок проценат протеина).

Због свог састава, високо вредних протеина и есенцијалних аминокиселина, масти и есенцијалних масних киселина, витамина и минерала, живинско месо представља веома квалитетну и концентровану храну и има важну улогу у исхрани људи. Због мале количине масти, нарочито месо бројлерских пилића, лако је сварљиво.

Живинарска производња одликује се великим бројем јединки на малом простору, интензивном производњом у кратком временском периоду и високим производним захтевима. Селекција у живинарству има за циљ да се добију јединке које ће за што краће време постићи што већу телесну масу са што мањим утрошком хране. Ово је повезано са одређеним променама у организму, посебно у имунском систему, што доводи до слабијег имунског одговора. Нарочито се истиче веома брзи раст (са просечно 40g на почетку производње, првог дана живота, бројлерско пиле достигне на крају производње, 35-тог дана живота око 2000g, што износи повећање телесне масе за око 50 пута) као извор стреса код живине, који се испољава појавом различитих обољења.

Потребе тржишта, које су веће од производних капацитета, условљавају све већу производњу, што често доводи до непоштовања зоохигијенских и санитарних мера у живинарској производњи (усељавање више старосних категорија у један производни објекат, „all in – all out“ принцип не примењује се увек, неиспуњавање зоохигијенских услова у производним објектима, кратак временски период између два производна турнуса, неспровођење или делимично спровођење дезинфекције производних објеката, транспорт утовљених пилића до клаонице камионима који нису дезинфиковани и сл.).

Услови које постављају селекција и тржиште, често доводе до појаве обољења, угинућа и губитака у живинарској производњи. Ово је нарочито опасно, када је реч о зоонозама (салмонелоза, инфлуенца птица и др.).

Инфекције животиња и људи салмонелама, заузимају значајно место у ветеринарској и хуманој медицини. Салмонелоза код људи најчешће се јавља као последица конзумирања хране контаминиране патогеним врстама салмонела. Један од најчешћих узрочника салмонелозе животиња и људи је *Salmonella* Enteritidis.

У живинарској производњи, у циљу контроле (превентива и терапија) заразних болести и економичније производње, користе се антибиотици, вакцине, пробиотици и пребиотици.

Употреба антибиотика у живинарској производњи није ограничена само на терапију болесних јединки, него је проширена и на превентивну употребу код изложености инфекцији (пренасељеност, транспорт и сл.).

Употреба антибиотика у борби са патогеним микроорганизмима носи ризик од поремећаја сапрофитске бактеријске флоре, настајања суперинфекције, стварања резистентних сојева бактерија, појаве преосетљивости на антибиотике и настајања токсичних реакција.

С обзиром на негативне ефекте антибиотика, прибегава се стратегији примене вакцина и додатака сточној храни.

Вакцинација као мера која се предузима у циљу превенције болести живине, примењује се у већем делу живинарске производње у Републици Српској. Спроводи се у свим облицима живинарске производње, углавном према предложеном програму имунопрофилактике, осим код мањег броја произвођача, који вакцинацију спроводе према сопственој процени и нахођењу, обзиром на могућност слободне куповине вакцина и њихову примену. Према важећој законској регулативи Републике Српске, за одређене болести вакцинација је обавезна (атипична куга перади), док за остале није.

Употреба пробиотика и пребиотика, имајући у виду њихов утицај на здравље животиња и производне резултате, представља један од безбеднијих и економичнијих начина производње живине. Њиховом употребом постижу се ефекти слични као при употреби антибиотика, с тим што се избегавају нежељени ефекти (резидуе антибиотика, каренца, алергијске реакције, генотоксичност и др.). Сматра се да пробиотици делују на начин сличан дејству сапрофитске микрофлоре дигестивног тракта, адсорпцијом токсина, конкуренцијом за адхезивна места, изазивањем поремећаја метаболизма других бактерија, супресијом раста микрофлоре или стимулацијом имунитета, док пребиотици имају улогу у стимулацији имунског одговора, спречавању колонизације црева патогеним бактеријама, улогу хранљивих састојака за епителне ћелије црева и антитуморозна својства.



## 2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

### 2.1. Салмонелоза

Салмонелозу, болест животиња и људи, изазивају микроорганизми из рода *Salmonella* (из фамилије *Enterobacteriaceae*), који обухвата више од 2400 серолошки различитих варијанти. Серотипови су углавном добијали име по месту првобитне изолације. (Wray и Wray, 2000.).

#### 2.1.1. Значај салмонелозе

Развојем интензивне живинарске производње широм света, препозната је улога живине у инфекцијама људи салмонелом. Значај салмонелозе птица као проблема, у порасту је, нарочито током последњих година. У прошлости, основни мотив за контролу салмонелозе код живине, био је смањење губитака у производњи. Данас, интерес јавног здравља, политички притисци и потрошачи, захтевају повећање превенције храном преносивих болести људи, као главни приоритет за произвођаче живине (Wray и Wray, 2000.).

Присуство салмонела код живине има далеко већи значај као могући извор заразе за људе, па је зато праћење присуства и кретања салмонела у јатима живине, први корак у контроли ове зоонозе, који се касније наставља микробиолошким контролом меса живине, јаја и њихових производа (Orlić и сар., 2001.).

#### 2.1.2. Салмонелоза птица

Бактерије рода *Salmonella*, изазивају различите акутне и хроничне болести живине. Осим тога, инфицирана живина представља један од најважнијих резервоара салмонела, која може да се пренесе на људе, путем ланца исхране (Wray и Wray, 2000.).

*Salmonella spp.* код живине изазивају локалну или инфекцију системског карактера, али могу изазвати и хроничну асимптоматску инфекцију. Инфекције живине салмонелама, тифус живине (узрочник *Salmonella Gallinarum*), бели пролив пилића (узрочник *Salmonella Pullorum*), паратифус (узрочник *Salmonella Enteritidis* и *Salmonella Typhimurium*) и аризоноза (узрочник *Salmonella Arisonae*), изазивају економске губитке у свим деловима света са развијеном интензивном живинарском производњом, али и у подручјима где је чест и отворени начин држања живине (Resanović и сар., 2009.).

##### 2.1.2.1. Паратифусне инфекције

Паратифус живине узрокују покретни серотипови салмонела, од којих су најчешћи узрочници *Salmonella Enteritidis* и *Salmonella Typhimurium*. Ови организми могу инфицирати веома различите домаћине (укључујући људе). Код живине паратифус углавном пролази асимптоматски, док код људи ове бактерије изазивају симптоме тровања храном (Breytenbach, 2004.).

Од првог извештаја о салмонелози код птица и појаве инфективног ентеритиса код голубова (**Moore, 1985.**), паратифус наставља да узрокује значајне штете код младе живине (**Saif, 2003.**).

Инфекције домаће живине са салмонелама су скупе, и за живинарску производњу и за друштво уопште. Трошкови настали услед салмонелозе изазване *Salmonella* Enteritidis, сврставају се у две велике категорије. Прва обухвата трошкове, повезане са обољењима људи, узрокованим конзумацијом контаминираних производа живине. Друга категорија трошкова, повезана са салмонелама код живине, укључује различите директне трошкове произвођача, суочених са посљедицама инфекције салмонелама у њиховим јатима (**U.S. Department of Agriculture, 1995.**).

### 2.1.2.2. Етиологија

Род *Salmonella* припада фамилији бактерија *Enterobacteriaceae*, који је подељен на две врсте (species) *S. enterica* и *S. bongori*. *S. bongori* садржи десет серотипова (serovars) који су веома ретки, док је *S. enterica* подељена на шест подврста (subspecies), *S. enterica* subspecies *enterica*, *S. enterica* subspecies *salamae*, *S. enterica* subspecies *arizonae*, *S. enterica* subspecies *diarizonae*, *S. enterica* subspecies *houtenae*, *S. enterica* subspecies *indica* (**Wray и Wray, 2000.**).

Салмонеле су прави, неспорогени, Грам негативни штапићи, величине 0.7-1.5 x 2.0-5.0  $\mu\text{m}$ . Салмонеле које узрокују паратифус су углавном перитрихо обрасле флагелама и покретне, док су *Salmonella Gallinarum* и *Salmonella Pullorum* непокретне. Типичне колоније салмонела на агару су око 2 до 4 mm у пречнику, округле са глатким рубовима, благо уздигнуте и блистају. Салмонеле су факултативни анаероби и интрацелуларни патогени, а могу добро расти и у аеробним и у анаеробним условима. Оптимална температура за раст салмонела је 37°C, али раст је генерално забиљежен у распону од 5 до 45°C. Салмонела може да расте на рН који се креће од 4.0 до 9.0, са оптималним рН од 7.0. Нутрициони захтеви салмонела релативно су мали, и већина хранљивих подлога, које обезбеђују извор угљеника и азота, подржавају њихов раст. Салмонеле ферментишу глукозу (уз стварање киселине и гаса), дулцитол, манитол, малтозу и муцин, али не ферментишу лактозу, сахарозу, малонат или салицин. Стварају водоник сулфид на различитим врстама подлога, декарбоксилишу орнитин и лизин, користе цитрат као извор угљеника, и редукују нитрате у нитрите. Не хидролизују уреу и желатин, и не стварају индол (**Saif, 2003.**).

### 2.1.2.3. Патогенеза

Салмонеле које узрокују паратифус, могу бити изоловане из веома различитих врста домаћина, укључујући људе и остале сисаре, птице, гмизавце и инсекте. Живина је један од најважнијих резервоара салмонела. Паратифусне салмонеле могу да се унесу у јата живине из много различитих извора. Могу да се преносе вертикално са родитеља на потомство, хоризонтално директно и индиректно и псеудовертикално преко јаја чија је љуска контаминирана салмонелом. Вертикално преношење салмонела са родитеља на потомство, одвија се директно преко контаминираних јаја. Забраном употребе анималних протеина у храни за живину, смањена је могућност инфекције живине на овај начин (**Saif, 2003.**).

Говори се о пренаталном и постнаталном ширењу салмонелозе. Ако је настала пренатална инфекција, преко јаја, један дио ембриона угине, а из друге половине јаја развијају се слабо витални пилићи који, ако преживе, представљају трајне клицоноше.

Постнатално ширење болести настаје најчешће преко загађених инкубатора. Ако се при ваљењу или разбијању јаја у инкубаторима, њихов садржај сасуши, он се подиже у ваздух у виду прашине коју животиње удишу (аерогена инфекција). Ширење болести настаје и преко измета. Значајну улогу у преношењу салмонела имају људи (одећа, обућа, руке), глодари, дивље птице, инсекти, опрема и сл. Као потпомажући фактори у настајању болести суделују и различити стрес фактори, као што су варирање у температури, влага, неадекватна исхрана и нега, митарење и различите болести (**Knežević и Matejić, 1996.**).

Истраживања која су обухватала вештачке инфекције, показују да се пилићи лако инфицирају салмонелама преко хране, иако је ниво контаминације веома низак (**Hinton, 1988., Schleifer и сар., 1984.**).

Биолошки вектори могу истовремено раширити и умножити салмонеле у јатима живине. Инсекти, укључујући бубашвабе (**Koranic и сар., 1994.**) и мале брашњаре (**McAllister и сар., 1994.**), могу носити салмонеле у себи и на себи, и разносити их кроз фарме живине.

Мишеви су нарочито важни вектори *Salmonella* Enteritidis у јатима кока носиља. Узгајани су и узорковани мишеви у околини фарми кока носиља, ради изолације *Salmonella* Enteritidis. Утврђена је *Salmonella* Enteritidis у 24% мишева из околине контаминираних фарми, али ниједна код мишева из околине фарми слободних од *Salmonella* Enteritidis. Једна куглица мишјег измета садржавала је  $10^5$  *Salmonella* Enteritidis (**Henzler и Opitz, 1992.**).

Општа вируленција салмонела зависи доста од почетног степена инвазије слузокоже (**Amin и сар., 1994.**).

Адхеренција салмонела на епителне ћелије црева, први је значајан корак у низу догађаја који доводе до болести. Колонизација црева салмонелама и учесталост угинућа код пилића, у директној је корелацији са дозом орално унете салмонеле (**Saif, 2003.**).

Репликација салмонела унутар ћелија домаћина, такође је утврђена као неопходна, за потпуну експресију патогености (**Leung и Finlay, 1991.**).

Колонизација салмонела у цревима је углавном први корак инфективног процеса, код орално унетих салмонела, руковођена често са константним излучивањем салмонела изметом. Код многих инфицираних птица, даља инфекција гастроинтестиналног тракта, резултује умножавањем салмонела у ретикулоендотелијалном ткиву јетре и слезине, са евентуалним ширењем и колонизацијом различитих ткива. Коначно, опсежна бактеријемја, која се понекад деси, повремено узрокује високу појаву угинућа (**Barrow и сар., 1987.**).

Гастроинтестинални тракт је средина у којој долази до контакта антигена и мукозе црева. У мукози је смештено лимфоидно ткиво (GALT – gut associated lymphoid tissue), које, обзиром на укупну површину црева, чини гастроинтестинални тракт значајним имунолошким органом. Приближно се произведе  $10^{10}$  имуноглобулинских ћелија по метру танких црева, што износи око 80% укупно произведених имуноглобулинских ћелија у организму (**Targan и Shanahan, 1994.**).

Салмонеле веома брзо инвадирају интестиналну мукозу, колонизирајући ламину проприју мукозе и Пајерове плоче код сисара или лимфне накупине код птица (GALT). Одатле се лимфом разносе до регионалних лимфних чворова/накупина, где макрофаги, као прва линија одбране, покушавају да их спрече у даљем ширењу. Уколико овај механизам имунског система ефикасно спречи њихово даље ширење, инфекција остаје локализована у самом цреву и GALT-у. Уколико локална одбрана није у стању да инфекцију задржи на нивоу дигестивног тракта, тј. ако макрофаги не успеју да савладају урочника, инфекција се шири даље, путем мезентеријалних лимфних чворова

слезине и јетре и може настати системска инфекција. Током системске инфекције, салмонеле се шире од GALT-а до системске циркулације. Слезина и јетра обично су увећани током системске инфекције, зато што капиларни систем ових органа са ткивним макрофагима, представља ефикасан систем за елиминацију салмонела. Дигестивни тракт је неповољна средина за салмонеле (низак рН у желуцу, бактерицидно дејство жучних соли, компетитивно искључивање сапрофитске интестиналне флоре, цревна перисталтика). Салмонеле на разне начине избегавају одбрамбене механизме имунског система, укључујући отпорност на фагоцитне ћелије, комплемент, специфична антитела и ћелијски имунитет. Салмонела је отпорна на дејство комплемента као неспецифичну хуморалну компоненту имунског система. Ово је последица Rck гена *Salmonella spp.*, који ствара резистенцију на комплемент тако што кодира протеин који спречава везивање MAC (membrane attack complex) за мембрану. Фагоцитне ћелије, које су компонента урошеног имунског система, важна су одбрана против различитих патогена и представљају приоритетну нишу за салмонеле током умножавања у слезини и јетри. Салмонеле имају способност да, као и неки други микроорганизми, када је у ендоцитној везикули (фагозому), спречи везивање ендоцитне везикуле са лизозомом, и на тај начин преживи. Поред тога, у *in vivo* експериментима доказано је да су салмонеле цитотоксичне за макрофаге после инфекције макрофага у култури ткива. Одбрамбени механизми против *Salmonella spp.* обухватају хуморални и целуларни имунски одговор. Хуморални имунски одговор може бити серумски и мукозни тј. одговор слузокоже дигестивног тракта. Након недељу дана након инфекције, у серуму се могу детектовати антитела и тај имунски одговор траје око десет недеља. Прво се запажају IgM имуноглобулини, а затим IgG и IgA. Ниво имуноглобулина IgM и IgA постепено опада, док ниво имуноглобулина IgG перзистира током дужег периода. Серумски имуноглобулини вертикално пасирају у жуманце јајета. Присуство ових имуноглобулина може да доведе до супресије раста микроорганизма у самом јајету и на тај начин спречи ширење инфекције. Интензитет стварања антитела је индивидуалан и може да варира и током саме инфекције. На почетку инфекције, антифлагеларни титар је много виши док је липополисахаридни титар виши у каснијим фазама инфекције. Одговор антитела на флагеларни односно липополисахаридни антиген слаб је код младих јединки а код старијих изражен, док је серумски одговор на фимбријалне антигене SEF4 снажнији код младих јединки а умерен код старијих. Предоминантни имуноглобулини који се синтетишу у слузокожи дигестивног тракта су имуноглобулини IgA, а затим IgG и /или IgM. Имуноглобулини IgA могу се наћи и у секретима жучи и мукозе дигестивног тракта. Целуларни имунски одговор резултује синтезом Т лимфоцита, који имају ефекторске функције – цитолитички Т лимфоцити (Tctl), регулаторне функције – хелпер Т лимфоцити (Th) и супресорске функције – супресорски Т лимфоцити (Ts). Целуларни имунски одговор веома је важан код инјекција интрацелуларним микроорганизмима, током ког долази до директног уништавања патогена уништавањем инфициране ћелије или активацијом фагоцитне ћелијске одбране (Resanović i sar., 2009.).

#### 2.1.2.4. Клиничка слика

Салмонеле код живине изазивају локалну инфекцију или инфекцију системског карактера. Ток болести код пилића је углавном акутан а код кокошки акутан и хроничан. Хроничан ток често пролази асимптоматски. Први клинички знакови болести запажају се већ у инкубаторима, када долази до угинућа инфицираних ембриона или на пилићима непосредно после ваљења који су слабо витални,

сомнолентни и нагло угињавају, посебно од 6-10 дана живота. Угинућа подмлатка су највећа у прве две недеље живота. Оболели пилићи се скупљају око извора топлоте, не једу, имају опуштена крила, поспани су, обарају главу према земљи, накострешени су, имају повећану жеђ. Касније се појављује воденасти пролив са наслагама фецеса на клоаки и мршављење пилића. Код одраслих кокошки клинички знакови нису карактеристични, али се примећује пад носивости, слабо ваљење и смањен проценат оплођених јаја (**Кнежевић и Матејић, 1996.**).

Инфициране птице могу али и не морају да испоље клиничке знакове болести. Контаминација јаја салмонелама може довести до високог степена угинућа ембриона и брзог угинућа новоизлежених пилића. Знакови болести ретко су уочљиви након прве две недеље старости, мада морбидитет и морталитет могу бити високи током овог периода, са значајним заостајањем у расту. Ток болести је углавном акутан. Знакови паратифусне инфекције код младе живине у суштини су слични као код других инфекција салмонелама (пулорум болест, тифус, аризоноза птица) и других бактеријских инфекција, које могу да узрокују акутну септикемију (**Saif, 2003.**).

Мада клинички знакови болести углавном нису повезани са паратифусном инфекцијом код одрасле живине, за неке сојеве *Salmonella* Enteritidis утврђено је да доводе до анорексије, дијареје и пада носивости јаја код експериментално инфицираних кока носиља (**Gast и Beard, 1990., Gast и Beard, 1992., Nakamura и сар., 1993., Shivaprasad и сар., 1990.**).

Типични знакови паратифоидне инфекције пилића и живине укључују прогресивну сомноленцију са затвореним очима, опуштена крила и накострешено перје. Инфициране птице често подрхтавају и гомилају се близу извора топлоте. Профузна водена дијареја је учестала, резултујући дехидрацијом (**Saif, 2003.**).

Анорексија и исцрпљеност такође су присутни (**Barrow и сар., 1987.**).

Слепило и хромост могу бити повремено повезани са паратифусном инфекцијом (**Padron, 1990.**).

Клиничка слика и морталитет праћени су код SPF пилића White Leghorn, вештачки инфицираних са  $2 \times 10^4$  CFU *Salmonella* Enteritidis првог дана живота. Група је обухватала 64 пилета. Морталитет је био ограничен на прву недељу живота и износио је 8%. Пилићи су били апатични током прва три дана после инфекције, нису се кретали, без апетита и слабо су узимали храну. Дијареја је била присутна девет дана после инфекције. Током три недеље после инфекције, нересорбована жуманчана кеса могла се палпирати преко абдоминалног зида. Неки пилићи су имали опуштена крила док су други слабо узимали храну. У јату се уочавала хетерогеност, кроз присуство малих пилића (**Desmidt и сар., 1997.**).

#### 2.1.2.5. Патоанатомски налаз

При избијању акутног тока код новоизлежене живине, брзи развој септикемије може довести до високог морталитета, са мало или без видљивих лезија (**Barrow и сар., 1987., Gorham и сар., 1994.**).

Уколико је дошло до угинућа ембриона, на њима обично нема промена, а у ређим случајевима могу се уочити тачкаста крварења на жуманчаном кесама. Код постнатално уинутих пилића патоморфолошки налаз понекад може да буде негативан, али су лешеве обично дехидрирани са ретенцијом жуманчане кесе. Јетра и слезина су повећане, хиперемично хиперпластичне, са некротичним жариштима. Врло чест налаз је серофибринозни перикардитис са тачкастим крварењима испод перикарда. На миокарду понекад могу да се нађу некротична поља или избочења у облику чворова. У

дигестивном тракту може да се установи катарални или хеморагични дуоденитис, а у цекумима, који су дилатирани, сираст садржај. Често су изражене промене на очима у виду замућења сочива и рожњаче (гнојни ексудат). Код одраслих кокошки, код којих су промене у хроничном току првенствено ограничене на јајник, запажа се атрофија фоликула јајника, који су сасушени, смежурани и обично висе на дужим петелкама. Понекад ови фоликули прскају а садржај им се разлива између црева (**Кнежевић и Матејић, 1996.**).

Код пилића патоморфолошки налаз може изостати или се јави дехидрација, кахексија, коагулисан садржај жуманчане кесе, хиперемија јетре са тачкастим крварењима, хиперемија бубрега, хеморагични дуоденитис и адхезивни перикардитис. Код одрасле живине уочава се повећање и хиперемија јетре, слезине и бубрега, хеморагични или некротични ентеритис, перикардитис, перитонитис и хиперплазија и некрозе јајовода (**Bidin, 1998.**).

У акутном току, уочљив је јак ентеритис, често повезан са фокалним некротичним лезијама мукозе танких црева. У цекалним тонзилама често је присутан казеозни запаљенски ексудат. Слезина и јетра обично су отекле и конгестиране, са евидентним хеморагичним пругама или некротичним пољима. Бубрези такође могу бити увећани и конгестирани (**Padron, 1990.**).

Код салмонелозе, јетра и слезина су повећане, са дисеминованим појединачним или међусобно сливеним милијарним и супрамилијарним некротичним жариштима испод капсуле. У цревима се запажа дифтероидно циркумскриптно и конфлуентно запаљење мукозе или са дифузним дифтероидним мембранама које прекривају мукозу, а зид црева је задебљао. На јајнику се уочавају фоликули различитог облика, величине и боје, који су смежурани и слабог напона. У перикарду је присутна већа количина трансудата (**Ivetić и sar., 2003.**).

Фибринопурулентни перихепатитис и перикардитис су забиљежени у многим случајевима. Нересорбован коагулисан садржај жуманцета може бити присутан у жуманчаној кеси (**Barrow, 1991., Gorham и cap., 1994., Padron, 1990.**).

Други лезије које се повремено јављају су хипопион, панофталмитис, пурулентни артритис (**Padron, 1990.**), аеросакулитис (**Gorham и cap., 1994.**) и омфалитис (**Berchieri и cap., 1993.**).

#### 2.1.2.6. Дијагностика салмонелозе

Праћење салмонелозе код живине засновано је на периодичном тестирању јата, које обухвата различите методе, са утврђивањем позитивних јата, укључујући процену преваленце инфицираних јата или утврђивање промена у преваленци. У дијагностици најчешће су кориштене бактериолошке и серолошке методе (**EFSA, 2004.b.**).

Дијагностика салмонелозе поставља се на основу анамнестичких података, клиничке слике, патоанатомског налаза и лабораторијског испитивања. Мада клинички преглед може указивати на паратифус, коначна дијагноза се поставља изолацијом и идентификацијом узрочника. Употреба стандардних метода култивације захтева 48-96 часова (чак и дуже за одређене методе култивације). Серолошко утврђивање специфичних антитела често је ефективно кориштено као брзи прелиминарни начин провере, за идентификацију јата која су била изложена салмонелама (**Saif, 2003.**).

Лабораторијска дијагностика обухвата:

- бактериолошка испитивања,
- биохемијску идентификацију,
- серолошку типизацију,

- серолошка испитивања и
- молекуларна испитивања (**Wray и Wray, 2000.**).

Бактериолошко испитивање обавља се директном методом изолације из узорака и индиректном методом уз претходно обогаћење. Након бактериолошког испитивања обавља се биохемијска идентификација. За биохемијску идентификацију користе се бактеријске колоније израсле на чврстим диференцијалним хранљивим подлогама, које су изгледом карактеристичне за *Salmonella* Enteritidis. Испитује се активност ових бактерија на H<sub>2</sub>S, цитрат, уреу, метил црвено, индол, ацетилметилкарбинол (Voges Proskauer – VP), манитол, глукозу, лактозу, сахарозу, дулцитол, салицин, инозитол, сорбитол, арабинозу, рамнозу, малтозу, ксилозу, ескулин и желатин (**Swayne и cap., 1998.**).

Серолошка типизација заснива се на утврђивању соматског и флагеларног антигена. Салмонеле имају специфичан О антиген везан за тело бактерија и флагеларни Н антиген. Изузеци су само *Salmonella* Gallinarum и *Salmonella* Pullorum које не поседују флагеле па не поседују ни Н антиген. Код неких салмонела поред О и Н антигена налазимо и Vi антиген. Неке салмонеле имају и К антиген. На основу О антигена салмонеле су подељене у групе (Kauffmann-White шема). За серотипизацију потребно је имати специфичне О поливалентне и моновалентне серуме као и специфичне поливалентне и фактор Н серуме. За поступак пребацивања из једне у другу фазу Н антигена потребно је имати концентроване Н серуме. Серотипизација се изводи методом брзе аглутинације на предметном стаклу. Прво се обавља аглутинација са поливалентним серумом, затим са групним па онда са моновалентним серумима. Када се одреди припадност групи, утврђује се Н антиген (**Wray и Wray, 2000.**).

За утврђивање антитела на салмонеле, развијено је неколико серолошких тестова. Најчешће употребљавани тестови су брза крвна аглутинација, брза серумска аглутинација, класична макроскопска аглутинација у епрувети, микроаглутинација, микроантиглобулин тест и ELISA тест (Enzyme linked immunosorbent assays) (**Swayne и cap., 1998.**).

Од молекуларних испитивања, за генотипизацију салмонела, користи се PCR метод (Polymerase Chain Reaction) (**Wray и Wray, 2000.**).

#### 2.1.2.6.1. Бактериолошка дијагностика

Материјал за бактериолошко испитивање потребно је узорковати асептично, што је више могуће, да би се превенирала укрштена контаминација (cross contamination). Ово укључује употребу стерилног материјала за узорковање (стерилни брисеви, врећице и сл.) и рукавица. За испитивање се узимају:

- од уинулих животиња јетра, слезина, срце, крв из срца, јајник, јајни фоликул, око, мозак, црева анарочито цекум и цекалне тонзиле,
- од одраслих живих животиња клоакални брисеви или фецес,
- органи уинулих једнодневних пилића (јетра, слезина, жучна кеса, црева), меконијум или подлошке транспортних кутија,
- у инкубаторској станици уинули једнодневни пилићи, неизлежена јаја или валионички остатак и
- јаја (конзумна и расплодна) (**Swayne и cap., 1998.**).

Иако су предложени разнолики услови узгоја за изолацију и идентификацију паратифоидних салмонела, већина стандардних метода следи опште шеме које укључују четири утврђена корака. Први, неселективно предобогачење, употребљава се да подстакне раст веома малог броја салмонела или да омогући опоравак оштећених

ћелија салмонела. Други, селективно обогаћење, употребљава се да омогући додатно повећање популације салмонела, која је потиснута растом осталих организама. Трећи, постављање на селективне чврсте хранљиве подлоге, употребљава се да се добију изоловане колоније, свака добијена од појединачне ћелије. Четврти, колоније са испољеним карактеристикама салмонела, подвргавају се биохемијским и серолошким тестовима ради потврде њиховог рода и серотипизације. Селективне течне хранљиве подлоге, најчешће употребљаване за изолацију паратифоидних салмонела, су тетратионат бујон, селенит-цистин бујон и Rapoport-Vassiliadis бујон. Велики број чврстих хранљивих подлога на располагању је за изолацију паратифоидних салмонела, брилијант зелени агар, XLD агар, XLT4 агар и бизмут сулфитни агар (**OIE Manual, 2008.**).

У огледу, који је обухватао две групе бројлерских пилића, вештачки инфицираних малим дозама *Salmonella* Enteritidis у старости од једног дана и три недеље, рађено је бактериолошко испитивање клоакалних брисева пилића током 14 дана од инфекције. У групи пилића вештачки инфицираних перорално са  $10^2$ CFU/0.1 ml *Salmonella* Enteritidis првог дана живота, изолована је *Salmonella* Enteritidis из клоакалних брисева код 30% пилића, а 90% код пилића исте групе, инфицираних контактом. У групи пилића вештачки инфицираних перорално са  $10^4$ CFU/0.1 ml *Salmonella* Enteritidis у старости од три недеље, изолована је *Salmonella* Enteritidis из клоакалних брисева код 66% пилића, а 100% код пилића исте групе, инфицираних контактом. С обзиром да је код контактено инфицираних пилића учесталост појаве салмонеле била највећа, која је потврђена култивацијом клоакалних брисева, након жртвовања пилића у старости од 6 недеља, узети су клоакални брисеви, цекуми и јетре ради утврђивања који од ових узорака је најбољи за изолацију салмонела. Резултати јасно указују да је најбољи узорак цекум, обзиром да је салмонела константно изолована из овог органа код пилића инфицираних малим дозама салмонела, током трајања огледа, док у јетрама пилића салмонела није изолована на крају огледа (**Velhner и сар., 2005.**).

#### 2.1.2.6.2. Серолошка дијагностика

Потреба за серолошким дијагностиком салмонелозе јавља се када је потребно испитати велики број узорака, чиме се смањује време трајања испитивања. Имунолошке технике, као методе серолошке дијагностике, чине велику групу метода доступних у многим врстама тестова за дијагностику *Salmonella* spp. Технике које се користе у овим тестовима обухватају имунодифузију, ELISA тест, ELFA тест (Enzyme linked immunofluorescent assays), имуноаглутинацију, имуновезивање, имунопреципитацију и комбинацију ових техника (**Wray и Wray, 2000.**).

ELISA тест је развијен за утврђивање антитела на различите салмонеле. Најчешће употребљаван ELISA тест је ELISA тест за утврђивање антитела на *Salmonella* Enteritidis (**Swayne и сар., 1998.**).

Хуморални имунски одговор зависи од многобројних фактора, нарочито од дозе унетих салмонела, њихове вируленције и начина инфекције и старости организма. Уочена су случајеви лошег имунског одговора на инфекцију салмонелама код пилића у старости 1-2 недеље, и та слаба реактивност организма описана је као имунска парализа, која се објашњава недовољно развијеним имунским системом у тој старосној доби, брзим уништавањем лимфоидног ткива ових јединки и многим другим факторима (**Resanović и сар., 2009.**).

Током инфекције живине салмонелама, имунски систем одговара на инфекцију стварањем антитела на одговарајуће антигене детерминанте или активацијом ћелијског



имуног одговора, или на оба начина. Стварање антитела током инфекције обично се подудара са серолошким одговором, што подразумева да антитела могу бити утврђена у узорцима крвних серума инфицираних животиња. Серолошке методе могу се користити у комбинацији са бактериолошким методама. У току инфекције, бактерије не морају увек лако да се открију, а антитела могу да перзистирају неколико месеци иако је излучивање бактерија слабо. Са друге стране, док је инфекција у развоју, антитела не морају бити присутна, и таква јата могу избећи детекцију уколико се ради само серолошка дијагностика. Такође треба узети у обзир да вакцинација може изазвати позитиван серолошки одговор, осим ако се примени одговарајући дискриминаторни тест, који омогућује разликовање антитела насталих као резултат вакцинације од антитела насталих као последица инфекције. ELISA тест је развијен као кућни метод у одређеном броју земаља, и такође је у употреби у националним програмима за контролу салмонела, као нпр. комбиновани LPS ELISA тест (липополисахаридни ELISA тест), који се користи за утврђивање антитела у жуманцету јаја у јатима кока носиља у Данској. Одобравање ових тестова од стране међународних тела за валидацију није урађено, и они нису подударни са међународним стандардима, за разлику од бактериолошких метода дијагностике салмонела (**EFSA, 2004.b**).

Развијен је ELISA тест за утврђивање антитела на *Salmonella* Enteritidis уз кориштење моноклонских антитела. Кориштењем теста у испитивањима, која су обухватала и друге бактерије и серотипове *Salmonella* Enteritidis, добијени су резултати који су показали високу специфичност и осетљивост теста (**Brigmon и сар., 1992.**).

За испитивање крвних серума људи инфицираних салмонелама, развијен је имуноензимски тест којим је испитивано присуство имуноглобулина IgM, IgG и IgA. Као антигени у тесту, употребљавани су липополисахариди *Salmonella* Typhimurium и *Salmonella* Enteritidis. Применом овог теста утврђено је присуство специфичних антитела против салмонела у 130 крвних серума, чиме је потврђена могућност примене имуноензимског теста за утврђивање присуства специфичних антитела против салмонела код људи, код којих изолација салмонела стандардним бактериолошким методама више није била могућа (**Isomaki и сар., 1989.**).

Упоредним испитивањима осетљивости тестова који се користе у дијагностици салмонела, ELISA теста, брзог слајд теста, теста микроаглутинације и микроантиглобулинског теста, утврђен је висок степен корелације добијених резултата (**Nicholas и Cullen, 1991.**).

У циљу избора одговарајућег ELISA теста, којим би се са сигурношћу могла потврдити инфекција *Salmonella* Enteritidis, рађена су упоредна испитивања четири ELISA теста са различитим антигенима, и то iELISA тест (индиректни ELISA тест) са флагелином *Salmonella* Enteritidis, iELISA тест са липополисахаридним антигеном *Salmonella* Enteritidis, cELISA тест (компетитивни ELISA тест) са моноклонским антителима против флагелина *Salmonella* Enteritidis и cELISA тест са моноклонским антителима против липополисахарида *Salmonella* Enteritidis. У испитивањима употребљавани су узорци крвних серума вештачки инфицираних једнодневних пилића и кока носиља, фаготипом 1 и 2 *Salmonella enteritidis*, *Salmonella* Typhimurium и *Salmonella* Panama. Утврђено је, да се само применом компетитивног cELISA теста са моноклонским антителима против флагелина *Salmonella* Enteritidis, могло успешно утврдити присуство специфичних антитела против *Salmonella* Enteritidis у узорцима крвних серума кока носиља (**Van Zijderveld и сар., 1992.**).

За утврђивање природне инфекције код пилића *Salmonella* Enteritidis, користи се ELISA тест са моноклонским антителима флагеларног антигена (**Van Zijderveld и сар., 1993.**).

Применом ELISA теста у испитивањима крвних серума птица вештачки и природно инфицираних *Salmonella* Typhimurium и *Salmonella* Enteritidis, проценат позитивних јединки кретао се од 15-90%, што зависи од инфективне дозе и начина инфицирања, чиме је потврђена могућност употребе ELISA теста за утврђивање присуства специфичних антитела против салмонела у крвним серумима птица (**Kles и сар., 1993.**).

У циљу утврђивања присуства специфичних антитела против *Salmonella* Enteritidis у узорцима крвних серума вакцинисаних пилића, рађена су упоредна испитивања више комерцијалних китова ELISA теста, чији резултати показују да је компетитивни ELISA тест испољио већу осетљивост у утврђивању присуства специфичних антитела против *Salmonella* Enteritidis (**Barrow, 1997.**).

Огледом који је обухватао две групе по 30 бројлерских пилића, вештачки инфицираних малим дозама *Salmonella* Enteritidis у старости од једног дана и три недеље, кориштен је ELISA тест за утврђивање специфичних антитела у узорцима крвних серума. Из једне групе, десет једнодневних пилића је перорално инфицирано са  $10^2$ CFU/0.1 ml *Salmonella* Enteritidis, десет пилића је инфицирано контактом, а десет је служило као контрола. Из друге групе пилића, старости три недеље, десет пилића перорално је инфицирано са  $10^4$ CFU/0.1 ml *Salmonella* Enteritidis, десет је инфицирано контактом, а десет је служило као контрола. Серолошким испитивањем узорака крвних серума пилића ELISA тестом, рађеним 3, 4, 5 и 6 недеља након инфекције једнодневних пилића и 2 и 3 недеље након инфекције пилића старости три недеље, није утврђено присуство специфичних антитела на *Salmonella* Enteritidis код обе групе пилића (**Velhner и сар., 2005.**).

Испитивањем спроведеним у Великој Британији, којим су обухваћене две фарме кока носила, смештене у географски удаљеним крајевима, испитано је 22120 крвних серума, комерцијалним iELISA тестом. На првој фарми нађено је 3% позитивних узорака крвних серума на присуство специфичних антитела на *Salmonella* Enteritidis и 2.9% неспецифичних узорака, док је 9751 узорак односно 94.2% био негативан. На другој фарми нађено је 1.1% позитивних узорака, 2.8% сумњивих и 11307 односно 96.1% негативних (**McMullin и сар., 1997.**).

У огледу, који је обухватао три групе пилића слободних од салмонела, које су имале по 100 једнодневних пилића, у трајању од 53 недеље, једна огледна група је храњена храном која је садржавала  $10^8$ CFU *Salmonella* Enteritidis, друга огледна група је храњена храном која је садржавала  $10^8$  *Salmonella* Typhimurium а трећа група је била контролна. Обављено је бактериолошко испитивање клоакалних брисева и органа пилића и серолошко испитивање крвних серума и жуманаца јаја огледних животиња, применом ELISA теста. У току прве недеље огледа, број пилића који је излучивао салмонеле фецесом, у обе огледне групе износио је 100%. Током трајања огледа, овај број се смањивао, тако да је у 16. недељи износио 6% у огледној групи инфицираној са *Salmonella* Typhimurium, а сличне вредности установљене су у 8. недељи огледа у огледној групи инфицираној *Salmonella* Enteritidis. У почетном периоду ношења јаја, утврђено је излучивање *Salmonella* Enteritidis код 40% јединки. Бактериолошким испитивањем и изолацијом узрочника из узорака органа, утврђено је присуство *Salmonella* Typhimurium и *Salmonella* Enteritidis после више од годину дана од инфицирања. Серолошким испитивањем крвних серума пилића старости 6-7 недеља, утврђено је присуство специфичних антитела у крвним серумима обе огледне групе, код 50% пилића. Током трајања огледа, специфична антитела су била присутна и у крвним серумима и жуманцима јаја обе огледне групе. Резултати испитивања указују да је, поред серолошких дијагностичких метода, у циљу откривања јага живине инфициране салмонелама, неопходна примена бактериолошких метода, посебно у

раним фазама инфекције, пре појаве специфичних антитела као одговор организма на антигене узročника (Skov и сар., 2002.).

### 2.1.2.7. Терапија

Терапија салмонелозних инфекција спроводи се у зависности од легислативе појединих земаља и врсте живине, и представља последњи вид борбе против салмонелозе.

Терапију салмонелозе могуће је спроводити антибиотицима и хемотерапеутицима али њихова честа употреба погодује настанку резистенције, те се нагласак ставља на превентиву (Bidin, 1998.).

При лечењу живине обољеле од салмонелозе могу се употребљавати различити антибиотици који смањују морталитет али не елиминишу узročнике из јата (Knežević и Matejić, 1996.).

Комбинована истовремена администрација полимиксин Б сулфата и триметоприма код пилића, спречила је и сузбила експерименталну инфекцију са *Salmonella* Enteritidis (Goodnough и сар., 1991.).

Различити антимикробни агенси, укључујући тетрациклине, неомицин, бацитрацин, и сулфа препарате (осим код кока носилца), одобрени су и редовно употребљавани код живине. Инјекциони гентамицин и спектиномицин одобрени су за употребу у контроли инфекције жуманчане кесе у валионици, посебно код ћурки (Muirhead, 1994.).

Антибиотици су се некад додавали живини у храну, у субтерапијским дозама, за стимулацију раста. Истовремена администрација терапијских и субтерапијских доза антибиотика може довести до стварања сојева салмонела резистентних на лекове, а тиме и потенцијално умањити ефекат лекова код животиња и људи (Gast и Stephens, 1988., Gast и сар., 1988., Kobland и сар., 1987.).

### 2.1.2.8. Имунопрофилактика

Примарни циљ употребе вакцина против салмонела у живинарској производњи је пораст отпорности на *Salmonella spp.*, чиме би се превенирало преношење салмонела преко меса и јаја на људе. У употреби су живе атенуиране и инактивисане вакцине. Вакцинација живине против салмонела део је комплексног програма контроле салмонела у живинарству и има за циљ смањење колонизације салмонела у цревима, смањено излучивање салмонела путем фецеса и преко љуске јајета, као и смањење колонизације салмонела у репродуктивном тракту живине. Вакцинација живим атенуираним вакцинама обично доводи до стварања јачег и дужег имунског одговора код живине у односу на инактивисане, вероватно због негативног ефекта на антигене током припреме инактивисане вакцине и зато што живе вакцине перзистентно презентују антигене имунском систему. Такође, инактивисане вакцине не изазивају потпуни целуларни одговор имунског система. И инактивисане и атенуиране вакцине доприносе значајној заштити против салмонела, мада ни једна ни друга врста вакцине не обезбеђује конзистентну непробојну баријеру против инфекције. Сви стресни фактори, дефицитарна исхрана, недостатак воде, прекомерна или недовољна количина топлоте, влага, амонијак, конкурентне инфекције и многи други фактори могу да компромитују ефекте вакцинације (Resanović и сар., 2009.).

Вакцинација живине живом атенуираном вакцином ефикаснија је од вакцинације инактивисаном вакцином, у заштити од инфекције узрокованом *Salmonella* Enteritidis,

која обезбеђује адекватну заштиту и спречава ширење инфекције, обзиром да узročник инфекције није излучиван фецесом имунизованих јединки (**Barrow, 1997.**).

Упоређивањем механизма специфичне и неспецифичне одбране организма живине при инфекцији и вакцинацији салмонелама, предност се даје новим генерацијама живих вакцина против салмонела. Живе вакцине против салмонела могу уклонити бактерије из MFC (мононуклеарног фагоцитног система) и произвести дуготрајан имунитет. Нове генерације вакцина против салмонела добијене су генетским инжињерингом, креирањем нових типова вируса. Имунизација живине живим вакцинама против салмонела, односно њиховим мутантима, доводи до јаког ћелијског имунског одговора, са свим карактеристикама Th1 (производњом IL-2, IFN $\gamma$ , IgG2 и са ниским IL-4 одговором) (**Velhner и Miljković, 2000.**).

Перорална вакцинација живине против салмонелозе, инактивисаном вакцином, није ефикасна у стимулацију имунолошке реакције заштитног карактера. Супротно томе, заштита се може постићи пероралном вакцинацијом живом атенуисаном вакцином, што се објашњава стимулацијом имунолошке реакције као последица активације Th-1 ћелија и стимулација синтезе IL-12 (**Lehmann и сар., 2001.**).

Испитивањем двовалентне инактивисане вакцине против *Salmonella* Typhimurium и *Salmonella* Enteritidis, која садржи редуковано гвожђе, двократно су вакцинисани пилићи, у 7. и 28. дану живота, а затим вештачки, перорално инфицирани ниским и високим дозама *Salmonella* Typhimurium, као и контактом инфицираних и имунизованих јединки. Резултати испитивања указују да је вакцинацијом пилића смањено насељавање унутрашњих органа салмонелама, након инфекције контактом са инфицираним пилићима, док задовољавајући ефекат вакцинације није постигнут код перорално инфицираних пилића, односно, није смањено насељавање унутрашњих органа салмонелама (**Clifton-Hadley, и сар, 2002.**).

У циљу спречавања инфекције младих пилића салмонелама, у периоду одсуства комплексне бактеријске флоре, која је присутна у цревима одраслих јединки, даје се предност живим атенуисаним вакцинама. Перорална вакцинација живом атенуисаном вакцином (произвођач Lohmann Animal Health) не стимулише синтезу довољне количине специфичних антитела IgM, која би се могла установити брзом крвном аглутинацијом (**Miljković и Radojičić, 2003.**).

### 2.1.2.9. Биосигурносне мере

Добра фармерска и добра хигијенска пракса (Good Farming Practise GFP and Good Hygienic Practise GHP), су скуп мера, које се примењују у контроли *Salmonella spp.* (**EFSA, 2004.a**).

Биосигурност је дефинисана као план здравствених мера, створен за заштиту популације од преносивих инфективних агенаса. Ово обухвата све мере које могу бити предузете за превенцију болести изазваних вирусима, бактеријама, гљивицама, протозоама, паразитима и преносницима (глодари, инсекти, дивље птице, људи, опрема итд.) (**Anonymous, 1999.**).

У живинарској производњи, биосигурносне мере користе се за смањење ризика од уношења *Salmonella spp.* у живинарске фарме и сродне (припадајуће) производње, фабрике сточне хране и инкубаторске станице. Свеобухватне биосигурносне мере изискују трошкове у набавци неопходне опреме, употреби дезинфицијенаса и осталих антибактеријских средстава и тестирањима у лабораторији. Мере укључују нпр. наменске чизме (и, у неким случајевима, заштитна одела), за сваки објекат, упутства и протоколе за хигијену руку, дезинфекционе баријере између „чистог“ и „прљавог“ дела

фарме (између објекта и осталих помоћних објеката) или предпросторе. Максимални ниво биосигурности је једино могућ где је велики обим производње, и где су могућности преношења *Salmonella spp.* на људе велике. Овакве мере, су уобичајено, једино у потпуности примењене у родитељским и дедовским јатима и обухватају третман хране високим температурама. Сточна храна је такође претходно испитана на *Salmonella spp.* употребом брзих метода, пре испоруке фармама. Фабрике сточне хране праћене су у току производње и развоја, испитивањем компоненти и завршног производа. Ово је веома чест и свеобухватан програм праћења *Salmonella spp.* на фармама и у инкубаторским станицама. Предмети инфицирани *Salmonella spp.* не смију доћи у контакт са птицама. Од посетилаца се може захтевати на увид негативан резултат испитивања фецеса, пре издавања одобрења за посету. Улаз са одобрењем је преко хигијенске баријере, са туширањем пре и после, уз употребу одобрене одговарајуће или наменске одеће. Опрема употребљена од стране коопераната је раније одобрена од произвођача или је обављена фумигација при уношењу у фарму (EFSA, 2004.b).

„All in – all out“ производња на свим фармама, један је од основних принципа ефективне биосигурности, примењив је у комерцијалном сектору, али није увек могућ у родитељским јатима због потреба успостављања мањих група птица великог генетског потенцијала. Таква стриктна биосигурност примењује се у бројлерској производњи и дедовским јатима у већини европских земаља, али мере могу бити мање стриктне у дедовским јатима неких конзумних кока носиља, ћурки и патки, где могу постојати фарме или инкубаторске станице које нису потпуно засноване на дедовској производњи (нпр. јаја од родитељских јата могу бити инкубирана у одређеним околностима као јаја са дедовских јата). Са аспекта родитељских јата, у конвенционалној али не у органској производњи, „all in – all out“ производња је уобичајена (Davies и сар. 1998., Davies и Breslin, 2003.).

Многи од описаних биосигурносних принципа су примењени, али у мањем интензитету, због коштања. Какогод, неопходно је стриктно успостављање „all in – all out“ производње, тако да неопходне активности могу бити примењене у обезбеђењу да *Salmonella spp.* не опстаје више од једног циклуса јата, тако да је могуће урадити потпуну депопулацију фарме, уклонити сав контаминирани материјал, опрати, дезинфиковати и испитати ради обезбеђења да је деконтаминација била успешна, пре поновног насељавања објекта. У комерцијалној бројлерској производњи, утврђивање статуса на *Salmonella spp.* код родитељских јата, контрола хране и спровођење чишћења и процедуре дезинфекције, може редуковати *Salmonella spp.* до смањења преваленце јата и индивидуалне преваленце (EFSA, 2004.b).

### 2.1.2.9.1. Третман хране и воде

Основа производње хране са минималном контаминацијом салмонелама је добра произвођачка пракса и успостављање система контроле критичних тачака од припреме до испоруке (Cooke, 2002.).

Какогод, није могуће потпуно искључити све изворе контаминације тако да се температурни третман углавном користи за деконтаминацију завршног производа. Температура од 85°C током 2 минута је препоручена за деконтаминацију, али, у пракси, то време је краће. Повећање употребе експанзионих и екструзионих система, који раде са високим температурама, али и даље пратећи наредне фазе пелетирања, осигурава додатни температурни третман за све, али посебно, очекиване, високо контаминиране састојке. Тако постоји проблем у неким фабрикама хране, који је

узрокован реконтаминацијом пелета, која може опстати годинама, или може даље учествовати у контаминацији узрокованом производном прашином од компоненти у производњи. У већини земаља, храна за комерцијалне конзумне коке носиле уобичајено није пелетирана или термички третирана, као ни храна за исхрану бројлера (Davis и Hinton, 2000, Jones и Richardson, 2004.).

Описан је широк спектар додатака храни и води, за контролу *Salmonella spp* код живине, али већина захтева велику скалу евалуације изложености (Van Immerseel и сар., 2002.).

Третман воде у клаоницама, подржан са оксидујућим киселим средствима, као што је водоник пероксид/перацетонска киселина или млечна киселина (Byrd и сар., 2001.), или натријум хлорид и натријум нитрат (Jung и сар., 2003.), има повољних ефеката на смањење контаминације бројлера салмонелама приликом шурења у процесу клања.

#### 2.1.2.9.2. Компетитивно искључивање

Компетитивно искључивање подразумева превенцију уласка или успостављања једне бактеријске популације у гастроинтестиналном тракту, зато што је ниша већ окупирана конкурентском бактеријском популацијом. Да би успела, каснија популација мора бити способнија да се утемељи или одржи у средини, или мора да производи инхибиторна једињења против конкурентске врсте (Bailey, 1987.).

Компетитивно искључивање је комплекс међусобног дејства микроорганизама, хранљивих састојака и фактора домаћина, који селективно спречава специфичне групе или родове/врсте/сојеве микроорганизама да населе интестинални тракт. Компетитивно искључивање обухвата стварање услова средине који селективно фаворизују добре бактерије (нормална цревна микрофлора) а коче развој лоших бактерија (патогене бактерије) (Blankenship и сар., 1990., Stavric и сар., 1985.).

Код система слободног држања и код екстензивне производње, новоизлежене птице изложене су, током првих неколико дана живота, различитим интестиналним бактеријама из њихове околине. Колонизација црева овим бактеријама, превенира улазак салмонела и осталих штетних бактерија. Оваква супресија нормалном флором, позната је као „компетитивно искључивање“ (Pivnick и Nurmi, 1982., Schneitz и Mead, 2002.).

Компетитивно искључивање представља процес којим корисне бактерије искључују патогене (Hakkinen и сар., 1997.).

У неким земљама, примена производа компетитивног искључивања, која обухвата недефинисане или делимично дефинисане културе, добијене од интестиналних микроба живине, кориштена је као дио главног програма контроле салмонела (Wierup и сар., 1988., Wierup и сар., 1992.).

Доступни су различити комерцијални производи и они имају различите нивое ефикасности (Nakamura и сар. 2002., Ferreira и сар., 2003.).

У основи концепта компетитивног искључивања је способност повећања колонизационог отпора једнодневних пилића против салмонела (BIOMIN Newsletter, 2005.).

Да би било ефикасно, компетитивно искључивање треба бити примењено кратко пре потенцијалног излагања салмонелама, тако да је примена путем спреја у валионицама генерално супериорнија у односу на примену путем воде на фармама (Mead, 2000., Patterson и Burkholder, 2003.).

## 2.2. Додаци сточној храни

У циљу бољег искориштавања хране, дуже одрживости, лакше манипулације, повећања производње и побољшања квалитета намирница анималног порекла, основним хранивима додаје се велики број адитива који имају различите намене. Адитиви се описују као супстанце које, додате другим хранивима, у малим количинама, потенцирају корисне а супримирају штетне ефекте хране. Додаци сточној храни, у ужем смислу, обухватају разноврсне материје, које не смеју да буду штетне а морају да испоље ефикасност у смислу намене (**Sinovec, 2000.**).

Пронутритивне материје дефинишу се као микроингредиенти, који унесу оралним путем, у релативно малим количинама, поправљају хранљиву вредност obroка за животиње (**Rosen, 1996.**).

У последње време, велику пажњу привлаче стимулатори раста. С обзиром да је употреба антибиотика забрањена, који представљају најпознатије и најраширеније стимулаторе раста, све већи значај имају алтернативна решења, као што су пробиотици и пребиотици (**Sinovec, 2000.**).

Значај наведених стимулатора раста је у чињеници да само здрав организам животиње може у потпуности испољити генетски потенцијал производних својстава (**Sinovec и Ševković, 1999.**).

Доказано је да пробиотици имају повољне ефекте на здравље организма (боље перформансе), као што су позитивни ефекти на превенцију интестиналних поремећаја и микроекологију гастроинтестиналног тракта (**Fuller, 1989.**).

Пробиотици се примењују као додаци храни у производњи хране за животиње. *Salmonella spp* је главна мета њиховог превентивног ефекта. Примењене пробиотске врсте припадају углавном родовима *Lactobacillus* или *Enterococcus*, као што је *Bacillus* или *Saccharomyces*. Њихове клиничке особине тестиране су у неколико студија код људи (**Marteau и Rambaud, 1993., Saxelin, 1997.**).

Клинички ефекти пробиотика, као што су утицај на раст, разматран је на фармама животиња, укључујући живину, нарочито за бактерију *Enterococcus faecium* (**Gutzwiller и Wyss, 1988., Vuc и сар., 1990.**).

Друга сврха апликације је подршка терапији код клинички болесних животиња, нарочито превенција суперинфекција након антибиотске терапије (нпр. против *Salmonella spp*), терапије дијареје (бактеријске или друге) итд. Ова терапија може помоћи да се избегне терапија антибиотцима (**Charteris и сар., 1997.**).

Пребиотици, као додаци храни, створени да утичу на интестиналну флору на позитиван начин, могу такође бити кориштени, али постоје ограничене информације о њиховом ефекту на колонизацију салмонела. У експериментима *in vivo*, доказани су заштитни ефекти фруктоолигосахарида на колонизацију салмонела у дигестивном тракту пилића (**Bailey и сар., 1991.**).

### 2.2.1. Пробиотици и њихова употреба у живинарству

Пробиотици су додаци живих микроорганизама храни, који изазивају корисне ефекте код животиња домаћина, одржавањем еубиозе (**Fuller, 1992., Vanbelle, 1990.**).

Називом „пробиотик“ („за живот“) истиче се његово различито деловање у односу на антибиотике („против живота“), иако је механизам његовог деловања најчешће антибактеријски (**Rosen, 1996.**).

Уместо термина пробиотик, користи се и термин DFM (direct feed microbials), који подразумева извор живих микроорганизама, бактерија, гљивица и квасаца (**Miles и Bootwalla, 1991.**).

Кориштењем физиолошких потенцијала и механизма животиња, пробиотици представљају могућност за стимулацију раста, чијом употребом се постижу ефекти слични као и употребом антибиотика, али се избегавају нежељени ефекти (каренца, резидуе, резистенција, алергије, генотоксичност и сл.) (**Sinovec и Marković, 2000.**).

У циљу ефикасног кориштења у практичним условима, пробиотици морају да испуњавају следеће критеријуме:

- морају да буду погодни за ширу употребу и индустријску обраду, а да при томе остану живи,
- током лагерована и употребе морају да буду стабилни и живи,
- да буду у могућности да преживе у интестиналном екосистему и
- да животиње домаћини покажу боље производне резултате и здравствено стање, као ефекат заштите (**Fuller, 1991.**).

За производњу пробиотика користе се проверене врсте и сојеви корисних бактерија и то најчешће бацили (*B. subtilis*), лактобацили (*L. bifidus*, *L. acidophilus*) и стрептококе (*S. faecium*). Поред бактерија, у исту сврху користе се и квасци (*Saccharomyces* и *Torulopsis*). Готови препарати могу бити састављени од чисте културе или од мешаних култура микроорганизама (**Rajić и сар., 1996.**).

Дигестивни тракт здравих младих животиња, по рођењу, обично је стерилан (**Savage, 1987.**).

Убрзо након рођења, природном контаминацијом преко фецеса, младе животиње развијају цревну микрофлору сличну као код одраслих животиња. Пренос бактерија са родитеља на потомке, обавља се ефикасно и омогућава стварање заштитне цревне флоре у првим данима живота (**Rolfe, 1991.**).

Број бактерија у дигестивном тракту нагло се повећава од желуца према цекуму, а затим се незнатно повећава према колону и ректуму. У свим деловима дигестивног тракта преовладавају лактобацили, што је повезано са присуством угљених хидрата у храни, а затим следе *E. coli* (нарочито у дебелом цреву), стафилококе, стрептококе, кластридије и квасци. На број и врсту микрофлоре у цревима имају утицај храна (састав, конзумирање, начин исхране, додаци храни), старост животиње, хигијенски услови и услови у дигестивном тракту (**Forenbaher, 1983.**).

Популација микроба разликује се у појединим деловима дигестивног тракта, углавном услед разлика у физичко – хемијским условима, као и брзине кретања химуса кроз поједине делове црева. По доласку на свет, *E. coli* и ентерококе су, као први колонизатори, доминантни микроорганизми у цреву. Лактобацили се колонизују спорије, али убрзо постају бројнији у односу на њих, у горњем делу дигестивног тракта. Бактеријска колонизација је спорија у танком него у дебелом цреву, јер услови у дебелом цреву (приближно неутралан рН, анаеробиоза, смањен мотилитет) помажу сталан раст нормалних микроба, па врло брзо облигатни анаероби надмашују бројем остале бактерије. Иако дебело црево обезбеђује најпогоднију средину, микроорганизми колонизују и остале делове дигестивног тракта (вољку, желудац, танко црево и цекум) (**Sinovec, 2000.**).

Микроорганизми дигестивног тракта обезбеђују нормалну функцију слузокоже, повећавају сварљивост, стимулишу мотилитет и имунолошки систем (**Sinovec и Ševković, 1996.b.**).

Нормална микрофлора црева је способна да зауставља колонизацију црева патогеним микроорганизмима, што се назива колонизациони отпор (**Bilgili, 1995., Gorbach и сар., 1988.**).



Механизми којима нормална микрофлора успоставља колонизациони отпор заснивају се на стварању неодговарајућег рН, конкуренцији за хранљиве састојке, конкуренцији за места припајања на цревном епителу и локалној производњи антибиотика, односно бактериоцина (**Hentges, 1983., Sinovec и Marković, 2000.**).

Микроорганизми који су причвршћени за мукозу, као што су млечно-киселинске бактерије, немају потребу за брзим умножавањем и могу да преживе и издрже испирање мукозе, иако одржавају метаболизам на ниском нивоу. Ови микроорганизми окупирају нише које су сиромашне у хранљивим материјама за већину бактерија које не поседују способност адхеренције. Микроорганизми ближе лумену, који не поседују способност адхеренције, могу да преживе и издрже испирање мукозе само брзим умножавањем, при чему им је потребна довољна количина доступних хранљивих материја, уз ефикасан, вероватно оксидативни тип метаболизма (**Jansen и Van der Waaij, 1995.**).

Иако се употреба цекалног садржаја одраслих птица показала као ефикасно средство у борби против патогена, присуство штетних бактерија у цекалном садржају представља врло ограничавајући фактор. Због тога је индустрија усмерена на проналажење врста и сојева бактерија или њихових мешавина, које ће бити апсолутно безбедне за употребу (**Šefer и Sinovec, 1998.**).

Уочено је да у неким случајевима, апликација чистих култура стрептокока, лактобацилуса, бактериоида или бифидобактерија поседује заштитни ефекат у спречавању насељавања непожељне микрофлоре у дигестивном тракту, док у појединим случајевима није постигнут или је чак потенциран развој ентеропатогених бактерија. Сматра се да неке чисте културе могу чак да сметају еколошкој равнотежи интестиналне микрофлоре и да искључују корисне бактерије, чиме интестинална флора постаје мање комплексна и мање конкурентна у односу на ентеропатогене агенсе (**Imrey и сар., 1982., Spring, 1995.**).

Контрола патогених микроорганизама, применом пробиотика, постаје начин избора у гајењу живине и превенцији појаве обољења (**Šefer и Sinovec, 1998.**).

Употребу пробиотика у исхрани живине оправдава:

- стимулација раста уз бољу конверзију хране,
- контрола здравственог стања, нарочито колонизација дигестивног тракта корисном микрофлором, и спречавање насељавања непожељне микрофлоре као резултат различитих стрес ситуација,
- стимулација неспецифичног и/или специфичног имунског одговора и
- инактивисање и/или уклањање антинутритивних материја, као што су фитинска киселина, глукозинолати, трипсин инхибитори, лектини и нескробни полисахариди (**Sinovec и Ševković, 1996.a**).

Поред имуномодулације и јачања цревне баријере, пробиотици испољавају и друге ефекте:

- модификација гастроинтестиналне флоре,
- адхеренција на цревни епител у степену који спречава адхеренцију ентеропатогених бактерија,
- модификација протеина оброка,
- утицај на селективну пропустљивост цревног епитела и
- модификација капацитета бактеријских ензима, посебно оних који су везани за формирање тумора (**Lee и Salminen, 1995.**).

Одржавање еубиотских односа у дигестивном тракту представља један од најважнијих предуслова за очување здравственог стања животиња, а тиме и за повећање производње високо квалитетних и здравствено исправних намирница анималног порекла (**Sinovec и сар., 1998.**).

Нормалне цревне бактерије повећавају имунитет домаћина стимулишући развој и ефикасност имунолошких механизма на локалном и системском нивоу, а првенствено интестиналног имунског система (**Gaskins, 1996.**).

Стимулација имунског одговора одиграва се припајањем млечно-киселинских бактерија за зид црева и активирањем имунолошких механизма дигестивног тракта и/или могућношћу транслокације живих млечно-киселинских бактерија кроз слузокожу и стимулацијом општег и/или специфичног системског имунског одговора. Дејство корисних бактерија на системски или мукозни имунитет, заснива се на модулацији дејства интерлеукина, тумор некрозис фактора, интерферона и синтези фактора стимулације колонизације моноцита, као и индукцијом пролиферације моноклеарних ћелија, фагоцитном способношћу макрофага и модулацијом аутоимунитета и имунитета на поједине врсте бактерија (*Salmonella Typhimurium*, *Cryptosporidium parvum*) (**Freter и Nader de Macias, 1995.**).

Пробиотске бактерије, које могу побољшати функцију цревне мукозе, могу имати утицај на смањење алергијског одговора (**Sanders, 1999.**).

Млечно-киселинске бактерије испољавају антимуутагена и антитуморозна својства (**Nadathur и сар., 1994.**).

Утврђена је супресија карциногене мутације, кориштењем млечно-киселинских бактерија, односно њиховим метаболитима различитим од млечне киселине (**Hosono, 1988.**).

Млечно-киселинске бактерије и њихови метаболити испољавају антитуморозну активност према појединим туморима, која се може поделити на профилактичку и терапеутску (**Bounous и сар., 1991., Fernandes и сар., 1987.**).

Профилактичком применом смањује се потенцијални ризик од карциногенезе, елиминацијом и модулацијом прокарциногена у цревима домаћина. Терапеутском применом инхибира се раст тумора или ћелија тумора, превенира настанак метастаза и индукује регресија тумора (**Friend и сар., 1982.**).

Млечно-киселинске бактерије утичу на смањење активности ензима фекалних бактерија ( $\beta$ -глукуронидаза, нитрозоредуктаза, азоторедуктаза), који су повезани са прокарциногеном активацијом и смањеном екскрецијом мутагена (**Gibson и Wang, 1994.**).

Пробиотске бактерије стварају испарљиве масне киселине и млечну киселину, које смањују рН средине. Низак рН и висок садржај испарљивих масних киселина, ствара неповољне услове за раст великог броја ентеропатогених бактерија. Ниска електрохемијска реакција појачава антибактеријску активност кратких ланаца испарљивих масних киселина, повећавајући учешће недисосованих облика, који лакше пролазе кроз ћелијски зид бактерија, јер су без електростатског набоја, чиме се појачава бактериостатско и бактерицидно дејство. Утврђено је да јединке које имају већу концентрацију недисосоване пропионске киселине у цекуму, имају мањи број салмонела (**Spring, 1995.**).

Код бројлерских пилића третираних пробиотицима, у узорцима цекалног садржаја утврђено је присуство мањег броја салмонела и кампилобактерија (**Goren и сар., 1988., Mulder и сар., 1991.**).

Дигестивни тракт је, иако представља само мали део телесне масе, орган са највећим потребама у енергији и протеинима, што је повезано са великом површином и брзим изменама ћелија мукозе. Због тога се свака промена у морфологији, а тиме и у потребама у хранљивим састојцима, одражава на производне резултате (**Nouusiainen и Suoni, 1991.**).

Корисна микрофлора утиче на потребе организма на више начина:

- смањује измену протеина и потреба у енергији као последица слабијег степена пролиферације ћелија крипти и смањене масе дигестивног тракта,
- благо смањује потребе јетре у протеинима, везано за измењени имунски статус,
- повећава садржај аминокиселина, које су доступне за искориштавање од стране других ткива, посебно за стварање мишићне масе,
- смањује губитак протеина везаних за излучивање различитих биомолекула у дигестивни тракт (ензима, жучи), секрецију муцина и недовољну реасорпцију производа метаболизма у дигестивном тракту,
- повећава сварљивост и ресорпцију протеина и/или
- повећава активности сахаразе, лактазе и трипептидазе (**Chesson, 1994., Collington и сар., 1990.**).

У огледу на бројлерским пилићима, који је обухватао две групе по 50 пилића, у трајању од 42 дана, контролна група пилића је храњена храном без додатка пребиотика, а огледна група пилића уз додаток пробиотика All-Lac® у количини од 0.1%. Огледна група пилића, у односу на контролну, постигла је нижи прираст за 6.2% уз мању конзумацију хране за 11.3% и бољу конверзију хране за 5.5%, чиме је постигнута мања вредност утрошене хране за килограм прираста за 3.5% (**Sinovec и Marković, 2000.**).

Интестинални тракт одраслих људи потпуно је стабилан микробиолошки екосистем (**Tannock, 1990.**).

На акутно нарушавање успостављеног реда у интестиналном тракту вероватно утиче деловање антибиотика, болест или промене у исхрани. Исти аутор поставља хипотезу да додаток одређених егзогених микроорганизама (пробиотика), у интестиналном екосистему, може имати позитиван ефекат (**Tannock, 1983.**).

На хиљаде микроорганизама живи у заједници са човеком, на кожи, у устима, у интестиналном и урогениталном тракту. Микрофлора колоне углавном представља баријеру инвазији микроорганизама. Патогени микроорганизми често су установљени кад је микрофлора поремећена целом дужином црева због антибиотске терапије, промена у исхрани и физиолошких размена у цревима (**MacFarlane и Cummings, 1991.**).

Наводи из литературе указују на различите врсте и родове лактобацила, бифидобактерија и ентерокока који умањују учесталост канцера и дијареје, делују позитивно на имунитет, ублажавају алергију и друге сметње у интестиналном и урогениталном тракту, делују на ниво холестерола у крви и хипертензију и имају и друге здравствене ефекте, мада механизми дејства нису потпуно доказани.

Пробиотске бактерије или њихови крајњи производи могу инхибирати инфекцију са *Helicobacter pylori* код животиња (**Aiba и сар., 1998.**) и људи (**Micheti и сар., 1999.**).

Резултати испитивања указују на то да пробиотске бактерије не инхибирају подједнако *Helicobacter pylori*. За разлику од *Lactobacillus casei* и *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus salivarius* инхибира колонизацију *Helicobacter pylori* код мишева (**Aiba и сар., 1998.**).

Интестинални тракт може активирати различите имунске одговоре других ћелија из околине (**McCracken и Gaskins, 1999.**).

*Lactobacillus GG*, код деце узраста 2 до 16 месеци, спречава алергију на млеко крава (**MacFarlane и Cummings, 1991.**).

Антихипертензивно дејство пробиотских микроорганизама испитивано је код природно хипертензивних пацова (**Nakamura и сар., 1995., 1996.**) и у једном клиничком испитивању код људи (**Hata и сар., 1996.**). Изолована су два трипептида из млека, валин-пролин-пролин и изолеуцин-пролин-пролин, којег су ферментисали

*Saccaromyces cerevisiae* и *Lactobacillus helveticus*. Ови трипептиди делују као ангиотензин-1-конвертујући серум, који смањује крвни притисак.

Поједини делови ћелијског зида *Lactobacillus casei* YIT 9018 имају антихипертензивну активност (**Sawada и сар., 1990.**).

Пробиотске бактерије су састојци хране која умањује ризик од настанка канцера (**Hirayama и Rafter, 1999.**).

Пробиотици делују антимулагено на више начина, тако што грам позитивне и грам негативне бактерије везују мутагене пиролизате који се стварају током кувања на високим температурама, млечнокиселинске бактерије садрже угљенохидратни полимер у ћелијском зиду који врши апсорпцију мутагена а лактобацили разграђују канцерогене као што је N-нитрозамин (**MacFarlane и Cummings, 1991.**).

У резултатима добијеним у 15 испитивања, која обухватају 534 особе, у којима се испитивао утицај конзумираних производа од ферментисаног млека на ниво холестерола, утврђена је статистичка значајност смањења холестерола од 2,40-23,20%. Ови резултати не могу се потпуно прихватити јер није утврђен начин исхране испитаника, испитивање је кратко трајало, дуго је конзумирано ферментисано млеко, није контролисана физичка активност испитаника и био је мали број узорака (**Taylor и Williams, 1998.**).

### 2.2.2. Biomin® Poultry5Star

У последњих неколико година, велика пажња је посвећена пробиотцима и пребиотцима, у погледу њиховог потенцијала за побољшање здравља животиња. Термин синбиотик користи се када производ садржи заједно пробиотик и пребиотик, као што је случај са Biomin® Poultry5Star. Када се комбинују заједно пробиотик и пребиотик у једном производу, очекиване повољности су у побољшању преживљавања пробиотских бактерија током пасажа кроз горње партије дигестивног тракта и доста ефикаснија имплантација у дебелом цреву, са стимулативним ефектом пребиотика на раст и/или активност бактерија које делују повољно на здравље (нпр. бифидобактерије). Biomin® Poultry5Star је пажљиво одабран, вишебактеријски пробиотик, извор живих организама за живину, који садржи живе, способне за живот, природно одабране микроорганизме (пробиотик), који су класификовани као безбедни (Generally Recognized As Safe – GRAS). Biomin® Poultry5Star је развијен у сарадњи са међународним истраживачким пројектима, делимично основаним и од стране Европске Уније, у којима су изоловане бројне цревне бактерије, одређеног броја здравих пилића, које су типизирани комбинацијом морфолошких, физиолошких и генотипских метода. У односу на ове бактеријске врсте, успостављени су пробиотски критеријуми, као што су способност адхезије на цревне ћелије, инхибиција патогена (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Choleraesuis*, *C. jejuni*, *E. coli* и *Cl. Perfringens*), имунолошка активност, доступност крајњим производима метаболизма, као што су испарљиве масне киселине, ферментативна способност, отпорност на киселине и жучне соли, способност чувања и сигурносни статус (**BIOMIN Newsletter, 2006.**).

Синбиотски производ Biomin® Poultry5Star садржи пробиотик (живи микроорганизми), и то *Enterococcus faecium* (пореклом из јејунума), *Pediococcus acidilactici* (пореклом из цекума), *Bifidobacterium animalis* (пореклом из илеума), *Lactobacillus salivarius* (пореклом из цекума) и *Lactobacillus reuteri* (пореклом из вољке) и пребиотик фруктоолигосахарид инулин (**BIOMIN Newsletter, 2005.**).

Фруктоолигосахариди су добијени од природног извора, биљке која припада фамилији *Compositae*, *Cichorium intybus*, а који су способни за селективну

стимулацију раста корисне бифидобактерије у дебелом цреву (**BIOMIN Newsletter, 2006.**).

Особине и дејство Biomin® Poultry5Star огледају се у:

- одржавању и стимулацији раста здраве микробне популације у дигестивном тракту, у окружењу потенцијално оптерећеном патогеним узрочницима болести,
- успостављању корисне микрофлоре црева, након терапије антибиотцима,
- везивању патогених бактерија у дигестивном тракту чиме се смањује колонизација црева патогеним бактеријама,
- компетитивном искључивању,
- стимулацији имунског система,
- побољшавању општег здравственог стања и опште отпорности на болести,
- смањењу морталитета,
- повећавању прираста и искориштавању хране (**BIOMIN Newsletter, 2005., BIOMIN Newsletter, 2006.**).

У циљу испитивања утицаја Biomin® Poultry5Star на параметре раста бројлерских пилића, изведен је оглед на једнодневним бројлерским пилићима провенијенце Cobb, који су подељени у две групе, од по 470 пилића, са десет понављања за сваку групу. Обе групе пилића храњене су истом храном, док је једна група добијала путем воде Biomin® Poultry5Star у количини од 20g/1000птица/дану, у периоду од 1-3 дана, 10-12 дана, 18-20 дана и 30-32 дана старости. Код пилића који су добијали Biomin® Poultry5Star путем воде, уочена је већа телесна маса у петнаестом дану старости у односу на контролну групу пилића без Biomin® Poultry5Star у води (527g:515g), у тридесетом дану старости (1.598g:1.537g), и у четрдесетом дану старости (2.377g:2.283g), боља конверзија хране (1.71:1.75) и мањи морталитет (7.64:9.17) (**BIOMIN Newsletter, 2006.**).

У огледу који је изведен на једнодневним бројлерским пилићима, који су подељени у две групе од по 18 пилића, од којих је свака имала два понављања, испитиван је утицај Biomin® Poultry5Star на цекалну колонизацију са *Salmonella* Enteritidis. Пилићи су перорално инфицирани у трећем дану старости са 0.1 ml 10<sup>6</sup>CFU/ml *Salmonella* Enteritidis. У петом, седмом и десетом дану старости пилићи су жртвовани и садржај цекума је испитиван на присуство *Salmonella* Enteritidis. Третманом са Biomin® Poultry5Star, просечан број *Salmonella* Enteritidis у садржају цекума инфицираних пилића значајно је смањен (испод границе бројања), у поређењу са пилићима који нису добијали Biomin® Poultry5Star (**BIOMIN Newsletter, 2006.**).

Испитивањем утицаја Biomin® Poultry5Star на исхрану бројлерских пилића, у поређењу са AGP Avilamycin, изведен је оглед, у којем је уочен већи производни индекс код пилића који су добијали Biomin® Poultry5Star у односу на пилиће који су добијали AGP Avilamycin, оптимални однос цекалне микрофлоре, већа концентрација *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* и грам позитивних кока, и већа специфична активност бактеријских гликолитичких ензима, који имају важну улогу у разлагању несварених угљених хидрата, α-галактозидазе, β-галактозидазе, α-глукозидазе, β-глукозидазе, и β-глукуронидазе (**BIOMIN Newsletter, 2007.**).

### 2.2.3. Пребиотици и њихова употреба у живинарству

Пребиотици су несварљиви састојци хране, који повољно делују на домаћина, селективно стимулишући раст и/или активност једне или одређеног броја врста бактерија у дигестивном тракту, побољшавајући на тај начин здравствено стање домаћина (**Gibson и Roberfroid, 1995.**).

Поред фруктоолигосахарида, и други олигосахариди, рафиноза, стахиоза, или олигосахариди који садрже ксилозу, галактозу и малтозу, могу да испоље пребиотска својства (**Rumney и Rowland, 1995.**), мада манан олигосахариди добијају значајније место (**Newman, 1999., Newman, 1997.**). Манан олигосахариди су полимери манозе, који се састоје од веома разгранатих ланаца манозе – пиранозид јединица. Њихова структурна грађа обезбеђује отпорност на разлагање киселинама тј. дигестију, па зато могу пасирати желудац.

Пребиотици морају да испуњавају следеће критеријуме:

- да се не хидролизују или ресорбују у предњим партијама дигестивног тракта,
- да представљају селективан супстрат за једну или ограничен број пожељних бактерија,
- да стимулишу раст и/или метаболички активирају пожељне врсте бактерија и
- да буду у могућности да ремете присутну микрофлору у циљу здравије композиције (**Sinovec, 2000.**).

Због хемијске структуре, несварљиви угљени хидрати (олиго и полисахариди), неки пептиди, протеини и липиди не подлежу ензимској хидролизи нити се ресорбују у предњим деловима дигестивног тракта, па се називају „колонална храна“, односно храна која доспевши у задње делове дигестивног тракта служи као супстрат за присутне бактерије, индиректно обезбеђујући домаћине енергијом, метаболичким супстратима и есенцијалним микроингредијентима (**MacFarlane и Cummings, 1991.**).

Од набројаних састојака хране, несварљиви (нескробни) угљени хидрати једини задовољавају наведене критеријуме пребиотика. Иако су неки протеини и пептиди потенцијално несварљиви и испољавају локалне (помажу ресорпцију катјона) и системске (стимулишу имунски систем) ефекте, у процесу разлагања посредством микрофлоре ослобађају штетне продукте као што су амонијак и амини, док метаболизам несварљивих липида није довољно испитан. Несварљиви угљени хидрати обухватају различита једињења као што су несварљиви скроб, нескробни полисахариди (полисахариди ћелијског зида, хемицелулоза, пектини и гуме) и несварљиви олигосахариди (**Delzenne и Roberfroid, 1994.**).

За угљене хидрате, поред познатих и описаних функција као што су извор енергије и структурни елементи који учествују у одржавању морфолошког интегритета ћелија, сматра се да поседују и биолошке улоге, као што су:

- хормонска активност (могу да стимулишу или инхибирају активност појединих хормона),
- интерцелуларна адхезија (молекуле одређеног облика препознају идентични молекули специфичних рецептора),
- адхезија вируса на бактерије или циљне ћелије и
- модулација облика специфичних протеина у функционалне молекуле (**Breadly и cap., 1994.**).

Иако сви несварљиви угљени хидрати могу да се сврстају у колоналну храну, не могу сви да задовоље строге критеријуме пребиотика, јер су интестинални ферментативни процеси за већину наведених једињења неспецифични. Због тога стимулишу раст и/или активност различитих врста бактерија, укључујући и непожељне врсте, односно не показују селективност као један од главних критеријума класификације. Међу несварљивим полисахаридима највећи значај имају олигосахариди. Олигосахариди се састоје од 2-10 резидуа моносахарида, међусобно повезаних глукозидним везама (**Sinovec, 2000.**).

Као извори олигосахарида доступни животињама, могу се користити фруктоолигосахариди добијени из пшенице и зрневља лептирњача, манан олигосахариди ћелијског зида квасца, док се у хуманој медицини значајније количине

олигосахарида обезбеђују кориштењем банана, артичока, црног и белог лука, парадајза, меда итд. (**Mul и Perry, 1994.**).

Манани заједно са глуканима и хитином, представљају главне компоненте ћелијског зида квасца, у коме учествују око 30% (**Phaff и Kurtzman, 1984.**).

Сматра се да је квасац најбољи извор манан олигосахарида. Матрикс ћелијског зида квасаца (*Saccharomyces*) је глукан, који је покривен другим слојем маноза шећера, а састоји се од 30% манана, 30% глукана и 12.50% протеина. Иако је однос појединих компоненти независан од врсте квасаца, степен фосфорилације манана, као и интеракција манана, глукана и протеина, значајно се разликују (**Lyons, 1994.**).

Пребиотици доприносе повећаној виталности животиња, смањењу губитака и побољшању искориштавања хране, чиме се постижу оптимални производни резултати и повољан економски ефекат, па већ дуже време у свету представљају саставни дио многих индустријски произведених крмних смеша (**Sinovec и Ševković, 1996.b.**).

Предност пребиотика је то што су циљни микроорганизми нормални чланови цревне микрофлоре, која је окупира места адхезије, тако да не могу изазвати имунолошке проблеме који се могу јавити уношењем страних антигена. Такође, с обзиром на проблем преживљавања бактерија код примене пробиотика, овај проблем би могао бити решен истовременом применом пробиотика са пребиотицима. На овај начин, живи организми били би кориштени заједно са специфичним супстратом за њихов раст (фруктоолигосахариди + *Bifidobacterium*, лацитол + *Lactobacilli*) (**Pupavac и сар., 1998.b.**).

Олигосахариди нису разградиви од стране ендогених ензима и могу смањити искористивост енергије (**Coop и сар., 1990., Leske и сар., 1993.**).

Код кориштења пребиотика, уочено је повећање дужине јејунума, илеума и цекума пилића (**Trevino и сар., 1990.**), као и дужине цревних ресица у илеуму (**Choi и сар., 1994.**).

Око утицаја манан олигосахарида на сварљивост хранљивих састојака и утицаја на производне резултате постоје неслагања, јер поједини аутори нису успели да јасно утврде негативан утицај олигосахарида на сварљивост (**Waldroup и сар., 1990.**), док други аутори тврде да употреба олигосахарида не утиче битно на сварљивост појединих састојака (**Carre и сар., 1995., Durst, 1996.**).

Сматра се да постоје три могућа начина дејства комплексних шећера:

- улога хранљивих састојака које не могу користити патогене бактерије,
- блокада колонизације патогених бактерија и
- стимулација имунског одговора.

Пребиотици своје дејство испољавају локално или системски (**Marković и сар. 1997.**).

Механизам дејства манана заснива се на подударности структуре маноза и лектина који се налазе на бактеријским пилама и фимбријама. На површини бактерија, које и доминирају у патологији дигестивног тракта моногастричних животиња (*E. coli*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Vibrio*), налазе се лектини преко којих се бактерије припајају за епителне ћелије цревне мукозе, које на својој површини поседују полисахаридну структуру која конформацијски одговара лектинима. Додавањем манан олигосахарида долази до стварања комплекса манан – бактерија, чиме се онемогућава адхеренција патогених узрочника за цревни зид. Иако бактерије поседују и друге механизме адхеренције за епителне ћелије црева, који су резистентни на инхибицију манозама, велики број сојева *E. coli* (66%) и *Salmonella* (53%) поседују маноза осетљиве адхезине. Поред доминантног броја бактерија са манозо специфичним лектинима, у дигестивном тракту могу се наћи и поједине бактерије које на својој површини поседују лектине који структурно одговарају галактози и фруктози. Пошто манан олигосахариди нису разградиви од стране ендогених ензима, они пролазе несметано кроз дигестивни тракт

и доспевају до задњих партија, где се везују са бактеријама. На тај начин спречава се колонизација задњих партија дигестивног тракта патогеним бактеријама, избацујући их у спољну средину. У неповољним условима (промена рН цревног садржаја, лезије цревне слузнице) и продора патогених бактерија у предње партије дигестивног тракта, манан олигосахариди делују на исти начин, стварајући комплекс манан-бактерија, који неразграђен пролази кроз дигестивни тракт и избацује се у спољну средину (**Sharon и Lis, 1993.**).

Утврђено је да се *E. coli* са манозо специфичним лектинима не може припојити на површину епителне ћелије, када је присутна маноза. Исто тако, у *in vitro* испитивањима утврђено је да *E. coli* може да се помери са површине епителне ћелије за 30 минута од тренутка излагања мананима. Све ово указује да манан олигосахариди не само да спречавају припајање патогених бактерија на површину цревне слузнице, него да могу и да уклоне већ припојене бактерије (**Newman, 1996.**).

Огледи на бројлерским пилићима, храњеним уз додатак манан олигосахарида, показују знатно смањење насељавања цекума у инфекцијама *Salmonella Typhimurium* и *Salmonella Dublin* (**Newman, 1996.**), као и колонизацију *Campylobacter jejuni* (**Schoeni и Wong, 1994.**). Механизми на којима се заснивају наведени ефекти су снижавање цревне рН вредности, измена профила слободних масних киселина у цревима и заузимање манозо специфичних рецептора бактерија.

Испитивањем ефекта манан олигосахарида на цекалну микрофлору црева, у контролисаним условима, а посебно на ентеропатогене бактерије и колонизацију колиформних бактерија које поседују фимбрије типа 1, уочено је смањење броја салмонела у цекумима бројлера третираних манан олигосахаридом, а уочен је и мањи број јединки код којих је успела инфекција са *E. coli 15 R*. Број колиформа у цекуму био је значајно мањи, али исти ефекат није уочен испитивањем броја лактобацила, ентерокока и анаеробних бактерија (**Spring, 1996.**).

Селективност дејства манан олигосахарида заснива се на чињеници да пожељне врсте бактерија у дигестивном тракту (*Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrukii*), садрже ензим маназу, која спречава стварање комплекса, чиме је обезбеђена селективност везивања манан олигосахарида само за непожељне врсте бактерија, које не садрже овај ензим (**Sinovec, 2000.**).

Сматра се да су промене у микрофлори црева везане за промену микроструктуре епитела црева. Квасци, односно олигосахариди ћелијског зида, повећавају број пехарастих ћелија по јединици дужине цревних ресица, док се дубина крипти смањује. Повећање броја пехарастих ћелија изазива повећање лучења муцина, који служи као погодан медијум за раст, али и као извор хранљивих материја за цревну микрофлору. Дубина крипти указује на смањење брзине замене епителних ћелија, односно на смањење присуства бактерија које производе токсине, или на могућност супресије токсичних метаболита. На овај начин штеди се енергија и хранљиве материје потребне за раст епителних ћелија, који се могу искористити за повећање биомасе (**Breadly и cap., 1994.**).

Неки токсини, вируси и еукариотске ћелије имају способност везивања, препознавањем одређеног шећера на површини других ћелија (**Dewegowda и cap., 1994., Stanley и cap., 1993., Stanley и Sefton, 1998.**).

Системско дејство манан олигосахарида на животиње и људе, огледа се у позитивном дејству на имунски систем у случајевима тумора и бактеријских инфекција (**Mizuno и cap., 1995., Suda и cap., 1995.**).

Антитуморозна својства манана описана су углавном код паса и мачака (**Harris и cap., 1991.**).



У експерименту на ћуркама, којима су у храну додавани манан олигосахариди, утврђена је повећана продукција имуноглобулина, и то плазмних IgG и секреторних IgA (Savage и сар. 1996.). У својим експериментима, ове резултате су потврдили и други аутори (Ewing и Cole, 1994., Macdonald, 1995, Verword, 1997.).

Утврђено је да манан олигосахариди имају дејство адјуванса, односно да повећавају имунолошки одговор на антиген (Newman, 1994.).

Олигосахариди који садрже манозу могу да утичу на имунски систем стимулацијом јетре да лучи манозо везујуће протеине, који се везују за капсулу бактерија и покрећу механизам реакције везивања комплемента (Janeway, 1993.).

Повећање имунског одговора углавном је резултат дејства манан олигосахарида на макрофаге и моноците и огледа се у стимулисању фагоцитозе и ослобађању арахидонске киселине (Kennedy и сар., 1995.), леукотриена (Petersen и сар., 1994.), интерлеукина (Adachi и сар., 1994., Flory и сар., 1995.), интерферона (Sakurai и сар., 1995.) и тумор некрозис фактора (Ohno и сар., 1995.).

У испитивањима дејства различитих шећера у *in vitro* условима, на адхеренцију *Salmonella* Typhimurium на епителне ћелије једнодневних пилића, утврђена је инхибиција адхеренције са метил-а-D-манозидом и манозом више од 90% (Oyofu и сар., 1989.a).

Инхибиција адхеренције *Salmonella* Typhimurium са манозом (Oyofu и сар., 1989.a), рефлектовала се смањеном колонизацијом *Salmonella* Typhimurium, када је маноза додана у исхрани младих пилића (Oyofu и сар., 1989.b,c).

У циљу испитивања утицаја исхране са пребиотицима као стимулатора раста, на производне резултате и здравствено стање, изведен је оглед на 900 бројлерских пилића Нубро провенијенце, у трајању од 42 дана. Пилићи су подељени у три групе, две огледне, које су добијале Bio-Mos у храни у количини од 0.10% и 0.05%, и једну контролну, без додатка пребиотика у храни. Употребом манан олигосахарида у исхрани пилића, у огледним групама постигнут је већи прираст за 7-12% уз мању конзумацију хране за 6-7% и бољу конверзију хране за 13-17%. Уочен је нижи морталитет пилића у огледним групама (3.33% и 3.67%) у односу на контролну (4.67%), и повољнији рН цревног садржаја у танким (6.18% у односу на 5.73% и 5.86%) и дебелим (6.79% у односу на 6.22% и 6.32%) цревима (Pupovac и сар., 1998.a).

Олигосахариди из рафиноза серије (рафиноза, стахиоза, вербаскоза и ајугоза), присутни у зрневљу легуминоза, испољавају негативан ефекат на производне резултате бројлера (Peterson и Mackintosh, 1994.).

У огледу изведеном код бројлерских пилића, код пилића храњених храном са додатком пребиотика Bio-Mos, утврђен је, поред позитивног утицаја на производне резултате и електрохемијску реакцију цревног садржаја, доста већи број лактобацила у цревима, уз значајно мањи број колиформних бактерија и клостридија, у односу на пилиће храњене храном са додатком антибиотика или без стимулатора раста (Sinovec и сар., 2000.).

Фруктоолигосахариди, олигосахариди који су присутни углавном у воћу (банане), пшеници, луку (црном и белом), артичокама (инулин) и семењу лептирњача, налазе своју примену у хуманој медицини. Везивањем фруктоолигосахарида са појединим патогеним бактеријама, индиректно се мења микрофлора дигестивног тракта, у смислу смањења непожељних врста бактерија, што се широко користи у контроли дијареје код људи (Spiegel и сар., 1994.).

Такође, употребом фруктоолигосахарида смањује се крвни притисак, умањује ресорпција угљених хидрата и липида, доводећи до нормализације концентрације глукозе и серумских липида у крви (Yamashita, 1984.).

#### 2.2.4. Bio – Mos™ Alltech®

Bio – Mos™ Alltech® представља нову генерацију биолошких производа, чија је намена побољшање здравственог стања цревног тракта животиња. Bio – Mos™ се добија из хелијског зида квасаца. Обзиром да квасци припадају биљном свету, они стварају многе састојке који се јављају и у зеленим биљкама, укључујући и одређене угљене хидрате. Једно од тих једињења је и једноставни шећер маноза, који улази у састав сложених шећера манан олигосахарида и представља најважнији састојак препарата Bio – Mos™ (Alltech®).

Bio – Mos™ садржи делове хелијског зида квасаца *Saccharomyces cerevisiae* (Alltech Inc.).

Дејство Bio – Mos™ огледа се у следећем:

- везује патогене бактерије у дигестивном тракту чиме смањује колонизацију црева патогеним бактеријама и побољшава отпорност организма стимулацијом секреције имуноглобулина,
- делује повољно на епител црева, побољшава опште здравствено стање и општу отпорност на болести,
- смањује морталитет,
- смањује ризик од развоја резистенције на антибиотике код микрофлоре дигестивног тракта и представља алтернативу антибиотицима, који се користе у храни за животиње, у профилактичке и у терапеутске сврхе,
- побољшава носивост и излеженост и
- повећава прираст и искориштавање хране (Alltech®).

Патогене бактерије (*E. coli*, *Salmonella spp.*) поседују фимбрије типа 1, којима се везују за слузокожу цревних ресица, на чијој површини препознају рецепторе који садрже манозу. Пошто и Bio – Mos™ садржи манозу, бактерије се везују за њега, а не за цревне ресице, чиме се смањује колонизација црева са *E. coli* и *Salmonella spp.*. Манан олигосахарид поседује још једну изузетну особину. Носећи на себи причвршћене патогене бактерије, он подстиче имунски систем животиње на одговор, односно на стварање антитела (имуноглобулина), који побољшавају отпорност и штите животињу у случају инфекције. Наиме, кад су једном заробљене, ухвативши се у мамац који им је поставио Bio – Mos™, и везавши се за његову површину, а не за површину црева, патогене бактерије су изгубиле могућност да нашкоде животињи, али су и даље остале способне, самим својим присуством, да изазову одговор имунског система. На тај начин животиња добија двоструку корист од Bio – Mos™-а, заробљена бактерија не може више да проузрокује никакву штету, а у исто време имунски систем реагује на њено присуство и ствара антитела неопходна за борбу против других узрочника болести (Alltech®).

У циљу испитивања утицаја Bio – Mos™ на производне резултате бројлерских пилића, изведен је оглед са бројлерским пилићима провенијенце Arbor Acres x Ross 308, који су подељени у две групе, од којих је свака имала 4 понављања. Пилићи су држани у жичаном подном боксу са дубоком простирком, у коме се одгаја 70 пилића, уз густину насељености од 16 пилића/м<sup>2</sup>. Обе групе су храњене истом храном, осим што је пилићима огледне групе у храну додат Bio – Mos™ у количини од 1kg/t у стартеру, 0.75kg/t у финишеру I и 0.50 kg/t у финишеру II. Оглед је трајао 42 дана. Код пилића храњених храном са додатком Bio – Mos™, уочена је већа телесна маса за 0.75% у односу на контролну групу пилића без Bio – Mos™-а у храни, боља конверзија за 3.17% и мањи морталитет за 0.37% (Perić, 2004.).

У огледу изведеном на две групе од по 120 конзумних носиља провенијенце Nick Brown, старих од 54 до 74 недеље старости, испитиван је утицај Bio – Mos™ на

производне резултате, телесну масу и морталитет конзумних носиља. Код носиља храњених храном са додатком Bio – Mos™ у количини од 1kg/t, утврђена је већа носивост у односу на носиље храњене без додатка Bio – Mos™ (78.92%:75.50%), већа маса јаја (65.01g:65.56g), мање напрслих јаја (2.64%:3.59%), боља конверзија хране (2.00:2.09), већа телесна маса у старости од 54 недеље (1922g:1919g), већа телесна маса у старости од 74 недеље (1670g:1601g) и мањи морталитет (0.83%:7.49%) (**Bozkurt и Baser, 2003.**).

У серији од три огледа, са три дана старим пилићима, орално инфицираним са  $10^4$ CFU *Salmonella typhimurium* 29E, пилићи који су добијали 4.000 ppm манан олигосахарида Bio – Mos™, имали су смањену концентрацију *Salmonella Typhimurium* 29E у цекуму десетог дана старости. У другој серији, где је рађена инфекција *Salmonella* Dublin, био је мањи број пилића са салмонелом у цекуму у десетом дану старости, који су добијали манан олигосахариде. За тестирање дејства манан олигосахарида на концентрацију бактерија које немају фимбрије типа 1, урађена је инфекција *Salmonella Typhimurium* 27A. Међутим, није дошло до довољне колонизације пилића овом бактеријом, да би се проценило да ли манан олигосахариди блокирају њену цекалну колонизацију. Манан олигосахариди нису значајно смањили концентрацију колиформа у цекуму, мада их је било бројчано мање. Није било никаквог ефекта на цекалну концентрацију лактобацила, ентерокока, анаеробних бактерија, лактате, испарљиве масне киселине, или цекални pH (**Spring и сар., 2000.**).

### 3. ЦИЉ И ЗАДАЦИ ИСПИТИВАЊА

#### 3.1. Циљ испитивања

Циљ испитивања је да се добије детаљан увид у могућност истовремене употребе пробиотика или пребиотика са вакцином против салмонелозе, у јатима живине која се вакцинишу пероралним начином апликације вакцине.

#### 3.2. Задачи испитивања

Да би се остварио циљ испитивања, постављени су следећи задаци:

- праћење здравственог стање пилића,
- праћење телесне масе пилића,
- вакцинација пилића против *Salmonella* Enteritidis, атенуираном вакцином, пероралном апликацијом,
- вештачка инфекција пилића салмонелом (*Salmonella* Enteritidis),
- бактериолошко испитивање клоакалних брисева, јетре, слезине и цекума пилића, директном и индиректном методом изолације и
- испитивање крвних серума пилића ELISA тестом на присуство антитела на *Salmonella* Enteritidis.

## 4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

### 4.1. Материјал

#### 4.1.1. Узорци за испитивање

Оглед је изведен на 250 једнодневних бројлерских пилића оба пола, провенијенце СОВВ 500, просечне телесне масе  $40,7 \pm 4$  g. Бројлери су подељени методом случајног избора у пет група, две контролне и три огледне, са по 50 јединки у свакој групи.

Прва контролна група бројлера ( $K_1$ ) добијала је храну без додатака, није рађена вакцинација, као ни вештачка инфекција.

Друга контролна група бројлера ( $K_2$ ) добијала је храну без додатака, није рађена вакцинација, али је седмог дана урађена вештачка инфекција (*Salmonella* Enteritidis).

Прва огледна група бројлера ( $O_1$ ) добијала је храну без додатака, урађена је вакцинација против *Salmonella* Enteritidis и вештачка инфекција (*Salmonella* Enteritidis).

Друга огледна група бројлера ( $O_2$ ) добијала је храну са додатком Bio – Mos™ Alltech® и урађена је вакцинација против *Salmonella* Enteritidis и вештачка инфекција (*Salmonella* Enteritidis).

Трећа огледна група бројлера ( $O_3$ ) добијала је храну без додатака али је у води додаван Biomin Poultry5Star, током три дана, урађена је вакцинација против *Salmonella* Enteritidis и вештачка инфекција (*Salmonella* Enteritidis).

Бројлери су храњени потпуним смесама за исхрану пилића у тову, чији се сировински и хемијски састав мењао у зависности од доба живота огледних животиња. За исхрану бројлера кориштене су две потпуне смесе стандардног сировинског састава, које су у потпуности задовољавале потребе бројлера датих старосних категорија. Бројлери су напајани из ручних звонастих појилица у којима је свакодневно мењана вода. Контролне и огледне животиње храњене су и појене по вољи (*ad libitum*).

Према препорученом програму имунопрофилактике, пилићи су у 14. дану живота вакцинисани против атипичне куге перади а у 18. дану против заразне болести бурзе (према препорученом програму имунопрофилактике, друга вакцинација против заразне болести бурзе предвиђена је за 22. дан, али није рађена због дужине трајања огледа).

Првог дана огледа, обављено је бактериолошко испитивање органа и клоакалних брисева пилића уинутих у току транспорта, ради искључивања инфекције огледних пилића *Salmonella* Enteritidis, као и серолошко испитивање 10 крвних серума пилића, ради искључивања присуства антитела на *Salmonella* Enteritidis.

Оглед је трајао 22 дана. По завршетку огледа, пилићи су еутаназирани.

#### 4.1.2. Хранљиве подлоге, реагенси и серолошки тестови

За изолацију салмонела из различитих органа и клоакалних брисева пилића употребљене су хранљиве подлоге које су припремљене и користе се у Ветеринарском институту Републике Српске „Др Васо Бутозан“ Бања Лука. Селективно обогаћење узорака обављено је употребом течне селективне хранљиве подлоге селенит бујона (Selenite Broth). Након обогаћења, узорци, односно течна хранљива подлога пресијана је на чврсте диференцијалне хранљиве подлоге брилијант зелени агар (Brilliant green) и бизмут сулфитни агар по Вилсон Блеру (Wilson Blair). За испитивање биохемијских особина изолованих бактеријских колонија са чврстих диференцијалних хранљивих

подлога, изгледом карактеристичних за салмонелу, кориштене су хранљиве подлоге, реакције и реагенси: троструки шећер по Клиглеру, цитрат, уреа, метил црвено, индол, ацетилметилкарбинол (Voges Proskauer – VP), манитол, глукоза, лактоза, сахароза, дулцитол, салицин, инозитол, сорбитол, арабиноза, рамноза, малтоза, ксилоза, ескулин и желатин.

Серолошка типизација (тест аглутинације) изолованих бактеријских колонија обављена је дијагностичким серумима Завода за заштиту здравља Србије „Др Милан Јовановић – Батут“ Београд, а према Kauffmann – White шеми, заснованој на идентификацији соматских (O), флагеларних (H) и капсуларних (Vi) антигена.

За испитивање присуства антитела на *Salmonella* Enteritidis у узорцима крвних серума кориштен је компетитивни ELISA тест произвођача IDEXX Laboratories, (*Salmonella* Enteritidis Antibody Test Kit, Flock Check).

### 4.1.3. Инокулум

За вештачку инфекцију пилића, кориштен је инокулум, припремљен од теренског соја бактерије *Salmonella* Enteritidis.

Пре инокулације, *Salmonella* Enteritidis је култивисана на хранљивим подлогама, утврђена је њена биохемијска активност и урађена серолошка типизација, на начин описан у делу 4.2.3., у циљу идентификације и потврде бактеријске културе којом је обављена вештачка инфекција пилића.

## 4.2. Методе

### 4.2.1. Третман животиња

За време трајања огледа пилићи су држани у истим условима смештаја, у подном систему гајења на дубокој простирци од пиљевине. Свака група пилића била је смештена у одговарајући засебан простор, физички одвојена једна од друге, са дезинфекционим баријерама постављеним испред улаза у сваки простор. Пре постављања огледа извршена је припрема просторије у којој ће оглед бити изведен. Претходно је обављено санитарно прање, а затим и дезинфекција пода биодеградабилним дезинфицијенсом широког спектра антимикуробног дејства. Током огледа, зоохигијенски и микроклиматски услови у потпуности су одговарали технолошким нормативима за дату провенијенцу.

#### 4.2.1.1. Вакцинација

Вакцинација пилића урађена је првог дана живота (према упутству произвођача), одмах по усељењу, вакцином TAD SALMONELLA vac E произвођача „LOHMAN A.H.“ (паковање од 2000 доза у бочици). Вакцинисани су пилићи три огледне групе, и то  $O_1$ ,  $O_2$  и  $O_3$ .

Ово је лиофилизована атенуирана вакцина, за пероралну примену, која у једној дози садржи минимално  $1 \times 10^8$  CFU (енгл. Colony forming units – укупан број микроорганизама који формирају колоније) атенуираних *Salmonella* Enteritidis, сој 24/Rif 12/Ssq.

За вакцинацију је кориштена водоводска вода, одстајала 24 часа, којој је 2 часа пре ресуспендовања вакцине додано обрано млеко у праху у количини од 2g/l воде. Овако

припремљена вакцина је дата огледним групама, у „ручним“ појилицама (по две појилице за сваку огледну групу), у количини од 50ml по групи, односно 1ml по пилету. Вакцина је потрошена у року од једног часа од припреме вакцине.

Огледној групи пилића  $O_3$ , је након припреме вакцине, додат пробиотик/пребиотик Biomin® Poultry5Star, а затим је вакцина дата пилићима.

#### 4.2.1.2. Вештачка инфекција

##### 4.2.1.2.1. Стандардизација инокулума

Припрема инокулума за вештачку инфекцију, од теренског соја бактерије *Salmonella enteritidis*, урађена је из културе бактерија, култивисаних на чврстој хранљивој подлози (брилијант зелени агар) на температури 37°C током 24 часа. Неколико идентичних колонија ресуспендовано је у 5ml стерилног физиолошког раствора.

Стандардизација овако припремљене суспензије инокулума обављена је компарацијом са 0.5 Mc Farland стандардом, при чему се добија концентрација бактерија од  $10^5$  CFU/ml.

##### 4.2.1.2.2. Инокулација

У седмом дану живота, пилићи контролне групе  $K_2$  и три огледне групе  $O_1$ ,  $O_2$  и  $O_3$ , вештачки су инфицирани *per os* са 0,5ml стандардизоване суспензије *Salmonella Enteritidis* (инокулум је садржавао  $5 \times 10^4$  CFU/ml).

Инокулација је рађена стерилном стакленом аутоматском шприцом за вакцинацију, којој је претходно подешено дозирање од 0.5ml, кориштењем стерилног физиолошког раствора.

#### 4.2.1.3. Узимање узорка

##### 4.2.1.3.1. Клоакални брисеви

За узимање клоакалних брисева кориштени су стерилни комплети брисева, паковани у пластичну фолију, састављени од дрвених штапића на једном крају намотани ватом, а на другом крају са пластичним затварачем, који су убачени, сваки засебно, у пластичну епрувету.

Клоакални брисеви узимани су од свих група пилића, по 10 брисева од сваке групе, према следећој динамици:

- 2. дана живота (24 часа после вакцинације),
- 3. дана живота (48 часова после вакцинације),
- 4. дана живота (72 часа после вакцинације),
- 7. дана живота, пре вештачке инфекције,
- 12. дана живота, приликом првог жртвовања пилића,
- 17. дана живота, приликом другог жртвовања пилића и
- 22. дана живота, приликом трећег жртвовања пилића.

Клоакални брисеви означавају се арапским бројевима од 1 до 10.

#### 4.2.1.3.2. Крв

За узимање крви из крилне вене, кориштене су стерилне шприце и игле, уз претходну припрему и дезинфекцију места за вађење, алкохолем и ватом. Након вађења, крв је сипана у стерилне пластичне епрувете и остављена да стоји на собној температури 2 часа, да би се одвојио крвни серум од крвног коагулума, а након тога крвни серуми су одвајани у пластичне епрувете са затварачем и чувани у замрзивачу до почетка испитивања.

Крв је узимана од свих група пилића, по 10 узорача од сваке групе, према следећој динамици:

- 7 дана живота, пре вештачке инфекције,
- 12. дана живота, приликом првог жртвовања пилића,
- 17. дана живота, приликом другог жртвовања пилића и
- 22. дана живота, приликом трећег жртвовања пилића.

Узорци крви означавани су арапским бројевима од 1 до 10.

#### 4.2.1.3.3. Органи

Након жртвовања пилића, а пре извођења обдукције, вентрална површина тела пилића потапана је у алкохол. Обдукција пилића и узимање органа за бактериолошко испитивање, обављена је стерилним инструментима (маказе и пинцета) и рукавицама, при чему је, за обдукцију сваког пилета кориштен стерилан комплет инструмената и рукавица. Узимани су цели органи (слезина, јетра и цекуми), који су достављани у лабораторију у стерилним стакленим теглицама. Пре стављања у теглицу, вагањем је утврђена маса органа, сваког појединачно, ради одређивања количине течне селективне подлоге. Органи су уситњени и хомогенизовани мануелним путем, маказама и пинцетом.

Органи су узимани од свих група пилића, од 6 пилића из сваке групе, према следећој динамици:

- 7. дана живота,
- 12. дана живота и
- 22. дана живота.

Органи су означавани словима С – слезина, Ј – јетра и Ц – цекуми, док су пилићи означавани арапским бројевима од 1 до 6.

#### 4.2.1.4. Одређивање телесне масе пилића

Одређивање телесне масе пилића рађено је вагањем 7., 14. и 21. дана живота.

Вагано је по 10 пилића из сваке групе, након чега је одређивана просечна телесна маса пилића по групама, израчунавањем аритметичке средине.

#### 4.2.2. Праћење општег стања, клиничке слике и морталитета и патоанатомски налаз

Опште стање пилића, клиничка слика и морталитет, праћени су свакодневно, при чему је обраћана пажња на понашање пилића (у групи и појединачно), постојање клиничких знакова обољења (апатија, накострешеност перја, дијареја), угинуће и стање



стеље (влажност), о чему је вођена евиденција. У случају угинућа пилића, рађена је обдукција и бактериолошко испитивање органа и клоакалних брисева.

#### 4.2.3. Изолација и идентификација *Salmonella Enteritidis* из клоакалних брисева и органа пилића

Изолација и идентификација *Salmonella Enteritidis* из клоакалних брисева и органа (слезина, јетра и цекуми) пилића, обављена је методама које се примењују у Ветеринарском институту Републике Српске „Др Васо Бутозан“ Бања Лука. Обављена је директна изолација из узорака и индиректна изолација уз метод претходног размножавања (OIE Manual, 2008.).

Директна изолација из узорака клоакалних брисева и претходно хомогенизованих органа, обављена је директним засијавањем чврстих диференцијалних подлога брилијант зеленог агара и бизмут сулфитног агара по Вилсон Блеру, које су инкубисане током 24 часа на 37°C.

Индиректна изолација методом претходног размножавања, у циљу рехидрације *Salmonella Enteritidis* и оспособљавања за брже размножавања, обављена је на начин једноструког размножавања, засијавањем узорака на течну селективну подлогу селенит бујон, у односу 1:10, која је инкубисана током 18 часова на 37°C. Након инкубације, узорци, односно течна селективна подлога пресијана је на чврсте диференцијалне подлоге брилијант зелени агар и бизмут сулфитни агар по Вилсон Блеру, које су инкубисане током 24 часа на 37°C.

Бактеријске колоније изгледом карактеристичне за *Salmonella Enteritidis*, са чврстих диференцијалних подлога, пресијане су на троструки шећер по Клиглеру, и инкубисане током 24 часа на 37°C, а затим је, на основу промене боје у дубини и на косини, као и стварања гаса, утврђена активност бактерија према глукози, лактози и стварању водоник сулфида (H<sub>2</sub>S). Пресијане бактеријске колоније изгледом карактеристичне за *Salmonella Enteritidis*, на брилијант зеленом агару биле су црвене боје а на бизмут сулфитном агару по Вилсон Блеру црне боје са металним сјајем. Раст *Salmonella Enteritidis* на троструком шећеру по Клиглеру, карактерише жуто пребојавање дубине подлоге на дну епрувете (ферментација глукозе), црвена боја косине (без ферментације лактозе) и стварање стуба црне боје услед продукције водоник сулфида.

Идентификација *Salmonella Enteritidis* обављена је испитивањем биохемијских особина бактеријских колонија нараслих на троструком шећеру по Клиглеру, које су изгледом биле карактеристичне за *Salmonella Enteritidis*. За испитивање биохемијских особина кориштене су хранљиве подлоге, реакције и реагенси: цитрат, уреа, метил црвено, индол, ацетилметилкарбинол (Voges Proskauer – VP), манитол, глукоза, лактоза, сахароза, дулцитол, салицин, инозитол, сорбитол, арабиноза, рамноза, малтоза, ксилоза, ескулин и желатин. Уколико су биохемијске особине испитиваних бактеријских колонија изгледом карактеристичних за *Salmonella Enteritidis*, одговарале биохемијским особинама *Salmonella Enteritidis* (Табела 1.), обављена је њихова серолошка типизација.

Табела 1. Биохемијске особине *Salmonella Enteritidis*

Биохемијске особине	<i>Salmonella enteritidis</i>
H <sub>2</sub> S	+
Цитрат	+
Уреа	-
Метил црвено	+
Ацетилметилкарбинол (Voges Proskauer – VP)	-
Индол	-
Манитол	+
Глукоза	+
Лактоза	-
Сахароза	-
Дулцитол	+
Салицин	-
Инозитол	-
Сорбитол	+
Арабиноза	+
Рамноза	+
Малтоза	+
Ксилоза	+
Ескулин	-
Желатин	-

Серолошка типизација обављена је дијагностичким серумима, методом брзе аглутинације на предметном стаклу, при чему је, као почетна, кориштена бактеријска култура са троструког шећера по Клиглеру, чије су биохемијске особине одговарале биохемијским особинама *Salmonella Enteritidis*. Испитивана бактеријска култура, која је аглутинирала са дијагностичким серумима, који аглутинирају са *Salmonella Enteritidis*, означена је као култура *Salmonella Enteritidis* у испитиваним узорцима.

#### 4.2.4. Испитивање присуства антитела на *Salmonella Enteritidis* у крвним серумима ELISA тестом

Компетитивни ELISA тест произвођача IDEXX Laboratories (*Salmonella Enteritidis* Antibody Test Kit, Flock Check) је ензимски имуноесеј за утврђивање присуства антитела на *Salmonella Enteritidis* у узорцима крвних серума пилића и жуманчаним врећицама.

##### 4.2.4.1. Припрема узорака крвних серума

Узорци крвних серума невакцинисаних пилића, контролних група  $K_1$  и  $K_2$ , разређивани су разређивачем у односу 1:2.

Узорци крвних серума вакцинисаних пилића, огледних група  $O_1$ ,  $O_2$  и  $O_3$ , разређивани су разређивачем у односу 1:250. Ово разређење серума треба да омогући адекватно разликовање имуног одговора у узорцима крвних серума серопозитивних јединки изложених *Salmonella Enteritidis* од вакцинисаних.

#### 4.2.4.2. Опис и принцип извођења теста

Тест је извођен у микротитар плочама, које су пресвучене пречишћеним *Salmonella* Enteritidis антигеном. У току прве инкубације, специфична антитела на *Salmonella* Enteritidis присутна у узорцима крвних серума, реагују са имобилисаним антигенима у удубљењима микротитар плоча. После испирања микротитар плоча, у њихова удубљења додана су моноклонска антитела на *Salmonella* Enteritidis коњугована ензимом. Уколико у испитиваним узорцима крвних серума нису присутна антитела на *Salmonella* Enteritidis, моноклонска антитела на *Salmonella* Enteritidis коњугована ензимом реагују са имобилисаним антигеном у микротитар плочама. Уколико су у испитиваним узорцима крвних серума присутна антитела на *Salmonella* Enteritidis, моноклонска антитела на *Salmonella* Enteritidis коњугована ензимом, блокирана су њиховом реакцијом са имобилисаним антигеном у микротитар плочама. У следећој фази теста, коњугат који није реаговао је уклоњен а додан је супстрат хромоген. У присуству ензима коњугованог за моноклонска антитела на *Salmonella* Enteritidis, супстрат ствара реакцију која резултује појавом плаве боје. Очитавање резултата обављено је кориштењем спектрофотометра, мерењем интензитета боје, помоћу филтера за таласну дужину од 650 nm, чиме је одређена вредност адсорпције А. Резултати се добијају дељењем добијене вредности адсорпције узорка А са негативном контролом, чиме се добија S/N вредност. Количина антитела на *Salmonella* Enteritidis је обрнуто пропорционална вредности адсорпције А, а тако и S/N вредности. Присуство антитела на *Salmonella* Enteritidis указује на претходну изложеност *Salmonella enteritidis*, природном инфекцијом или вакцинацијом.

Обављено је двоструко испитивање свих узорака крвних серума, као и позитивне и негативне контроле.

#### 4.2.4.3. Интерпретација резултата ELISA теста

Да би тест био валидан, оптичка густина негативне контроле мора бити већа или једнака 0.80 а позитивна мора бити мања или једнака 0.50. Код другачијих вредности, техника извођења је под сумњом и тест треба поновити. Присуство или одсуство антитела на *Salmonella enteritidis* одређује се рачунањем S/N вредност за сваки узорак.

Рачунање се обавља на следећи начин:

1. Негативна контрола (средња вредност) \_\_\_\_\_
2. Позитивна контрола (средња вредност) \_\_\_\_\_
3. S/N вредност \_\_\_\_\_

Тумачење резултата обавља се на следећи начин:

1. Узорак код ког је S/N вредност већа или једнака 0.75, сматра се негативним.
2. Узорак код ког је S/N вредност између 0.74 и 0.60, испитивање треба поновити. Уколико је узорак поновљен, животиња треба бити узоркована и испитивање обављено дан касније.
3. Узорак код ког је S/N вредност мања или једнака 0.59, сматра се позитивним и треба да се потврди култивацијом.
4. Иmunски статус јата је најбољи начин праћења и прегледа вредности антитела у репрезентативним узорцима у функцији времена, што резултује профилем јата

кроз приказ дистрибуције вредности антитела и анализу промена статуса кроз време.

#### **4.2.5. Статистичка обрада података**

При обради података кориштене су релевантне статистичке методе.

За обраду података кориштен је програм SAS WINDOWS (Студентов т-тест за тестирање разлика између пропорција малих узорака за податке добијене изолацијом и идентификацијом *Salmonella* Enteritidis из клоакалних брисева и различитих органа пилића и мере варијације и Студентов т-тест за тестирање разлика између аритметичких средина малих узорака за податке добијене вагањем пилића).

## 5. РЕЗУЛТАТИ ИСПИТИВАЊА

### 5.1. Опште стање, клиничка слика, морталитет и патоанатомски налаз

Пилићи контролне групе  $K_1$  и огледних група  $O_1$ ,  $O_2$  и  $O_3$ , били су клинички здрави током целог периода трајања огледа. Код пилића ових група нису запажене промене које би указивале на заостајање у расту и промене у изгледу и понашању. Код пилића огледне групе  $O_3$  запажено је повећано узимање хране у односу на остале групе пилића, а код огледне групе  $O_1$  запажена је повећана влажност простирке. У контролној групи  $K_1$  и у огледној групи  $O_3$  није било угинућа пилића. У огледној групи  $O_1$  угинула су укупно четири пилета, једно пиле другог и два пилета трећег дана живота, код којих је приликом обдукције утврђено присуство наслага урата у уретерима и перикарду. Четврто пиле, телесне масе 82.3g, угинуло је десетог дана живота, чија телесна маса указује, поређењем са просечном телесном масом пилића ове групе у седмом дану живота (160.52g), да је реч о шкарт пилету. У огледној групи  $O_2$  угинула су два пилета, четвртог и петог дана живота, код којих је приликом обдукције утврђено присуство наслага урата у уретерима, перикарду и на јетри. Бактериолошким испитивањем органа (слезина, јетра и цекуми) и клоакалних брисева пилића огледних група  $O_1$  и  $O_2$ , угинулих у току огледа, директном и индиректном методом изолације, није изолована *Salmonella Enteritidis*.

Код пилића контролне групе  $K_2$  дошло је до промена у здравственом стању неколико дана након вештачке инфекције *Salmonella Enteritidis*. Запажена је воденаста пенушава дијареја светло смеђе боје, смањено узимање хране, повећана жеђ, блага депресија и веома влажна простирка од пиљевине. Морталитет је био знатно изнад технолошких норматива и износио 12%. Угинуло је 6 пилића, и то два пилета десетог и четрнаестог дана живота, и по једно пиле једанаестог и дванаестог дана. Обдукцијом пилића утврђене су увећане јетре и слезине, нересорбоване жуманчане кесе и фибринозни перикардитис.

### 5.2. Телесне масе пилића

#### Телесне масе пилића 7. дана живота

Вагањем пилића контролних и огледних група 7. дана живота, добијене су вредности приказане у Табели 2.

Табела 2. Телесне масе пилића 7. дана живота

Група	$\bar{x}$	Мере варијације				C <sub>v</sub> %
		S <sub>a</sub>	S <sub>e</sub>	I <sub>v</sub>		
				X <sub>max</sub>	X <sub>min</sub>	
$K_1$	141.20	11.05	3.49	155.10	115.30	7.82
$K_2$	143.40	12.34	3.90	166.90	124.40	8.61
$O_1$	160.52	16.71	5.28	182.80	133.30	10.41
$O_2$	147.60	12.63	4.00	163.80	126.30	8.56
$O_3$	163.49	10.08	3.19	178.20	149.60	6.16

Вагањем пилића контролних и огледних група 7. дана живота, није утврђена статистички значајна разлика.

### Телесне масе пилића 14. дана живота

Вагањем пилића контролних и огледних група 14. дана живота, добијене су вредности приказане у Табели 3.

Табела 3. Телесне масе пилића 14. дана живота

Група	$\bar{X}$	Мере варијације				C <sub>v</sub> %
		S <sub>d</sub>	S <sub>e</sub>	I <sub>v</sub>		
				X <sub>max</sub>	X <sub>min</sub>	
K <sub>1</sub>	462.50	19.25	6.09	491.10	424.70	4.16
K <sub>2</sub>	385.30	29.62	9.37	425.60	330.60	7.69
O <sub>1</sub>	412.80	22.03	6.97	448.50	385.60	5.34
O <sub>2</sub>	422.70	15.21	4.81	447.80	393.20	3.60
O <sub>3</sub>	431.24	9.17	2.90	442.20	416.90	2.13

Вагањем пилића контролних и огледних група 14. дана живота, утврђена је статистички значајна разлика између контролне групе K<sub>1</sub> и огледне групе O<sub>3</sub> за ниво вероватноће p<0.01, а између контролне групе K<sub>1</sub> и контролне групе K<sub>2</sub> као и огледних група O<sub>1</sub> и O<sub>2</sub> за ниво вероватноће p<0.001. Вагањем пилића контролних и огледних група 14. дана живота, утврђена је статистички значајна разлика између контролне групе K<sub>2</sub> и огледне групе O<sub>1</sub> за ниво вероватноће p<0.01, а између контролне групе K<sub>2</sub> и огледних група O<sub>2</sub> и O<sub>3</sub> за ниво вероватноће p<0.001. Вагањем пилића огледних група 14. дана живота, утврђена је статистички значајна разлика између огледне групе O<sub>1</sub> и огледне групе O<sub>3</sub> за ниво вероватноће p<0.05, док статистички значајна разлика није утврђена између огледне групе O<sub>2</sub> и огледних група O<sub>1</sub> и O<sub>3</sub>.

### Телесне масе пилића 21. дана живота

Вагањем пилића контролних и огледних група 21. дана живота, добијене су вредности приказане у Табели 4.

Табела 4. Телесне масе пилића 21. дана живота

Група	$\bar{X}$	Мере варијације				C <sub>v</sub> %
		S <sub>d</sub>	S <sub>e</sub>	I <sub>v</sub>		
				X <sub>max</sub>	X <sub>min</sub>	
K <sub>1</sub>	913.90	17.55	5.55	941.50	888.20	1.92
K <sub>2</sub>	836.70	19.27	6.09	866.10	802.20	2.30
O <sub>1</sub>	880.50	24.51	7.75	918.50	830.70	2.78
O <sub>2</sub>	889.30	19.99	6.32	923.40	861.20	2.25
O <sub>3</sub>	871.40	13.84	4.38	890.60	849.40	1.59

Вагањем пилића контролних и огледних група 21. дана живота, утврђена је статистички значајна разлика између контролне групе  $K_1$  и огледне групе  $O_2$  за ниво вероватноће  $p < 0.01$ , а између контролне групе  $K_1$  и контролне групе  $K_2$  као и огледних група  $O_1$  и  $O_3$  за ниво вероватноће  $p < 0.001$ . Вагањем пилића контролних и огледних група 21. дана живота, утврђена је статистички значајна разлика између контролне групе  $K_2$  и огледних група за ниво вероватноће  $p < 0.001$ . Вагањем пилића огледних група 21. дана живота, утврђена је статистички значајна разлика између огледне групе  $O_2$  и огледне групе  $O_3$  за ниво вероватноће  $p < 0.05$ , док статистички значајна разлика није утврђена између огледне групе  $O_1$  и огледних група  $O_2$  и  $O_3$ .

### 5.3. Резултати изолације и идентификације *Salmonella Enteritidis* из клоакалних брисева пилића

#### Резултати изолације и идентификације *Salmonella Enteritidis* из клоакалних брисева пилића контролних група $K_1$ и $K_2$ , 2., 3. и 4. дана живота

Бактериолошким испитивањем клоакалних брисева пилића контролних група  $K_1$  и  $K_2$ , 2., 3. и 4. дана живота, применом директне и индиректне методе изолације, није изолована *Salmonella Enteritidis*.

#### Резултати изолације и идентификације *Salmonella Enteritidis* из клоакалних брисева пилића огледних група $O_1$ , $O_2$ и $O_3$ , 2., 3. и 4. дана живота

Бактериолошким испитивањем клоакалних брисева пилића огледних група  $O_1$ ,  $O_2$  и  $O_3$ , 2., 3. и 4. дана живота, применом директне и индиректне методе изолације *Salmonella Enteritidis*, добијени су резултати како је приказано у Табели 5.

**Табела 5.** Процент изолације *Salmonella Enteritidis* из клоакалних брисева пилића огледних група, 2., 3. и 4. дана живота применом директне и индиректне методе изолације

Дан	Метода изолације	% изолације $\pm S_p$		
		Огледна група $O_1$	Огледна група $O_2$	Огледна група $O_3$
2.	Директна	20.00 $\pm$ 3.730	-	-
	Индиректна	30.00 $\pm$ 4.273	20.00 $\pm$ 3.730	30.00 $\pm$ 4.273
3.	Директна	10.00 $\pm$ 2.797	20.00 $\pm$ 3.730	-
	Индиректна	50.00 $\pm$ 4.663	30.00 $\pm$ 4.273	40.00 $\pm$ 4.568
4.	Директна	10.00 $\pm$ 2.797	10.00 $\pm$ 2.797	-
	Индиректна	40.00 $\pm$ 4.568	30.00 $\pm$ 4.273	30.00 $\pm$ 4.273

Бактериолошким испитивањем клоакалних брисева пилића огледних група, 2. дана живота, применом директне методе изолације, није изолована *Salmonella Enteritidis* код пилића огледних група  $O_2$  и  $O_3$ , док је код огледне групе  $O_1$  изолована код 20.00  $\pm$  3.730% пилића (Табела 5.). Бактериолошким испитивањем клоакалних брисева пилића огледних група, 2. дана живота, применом индиректне методе изолације, изолована је *Salmonella Enteritidis* код 30.00  $\pm$  4.273% пилића огледних група  $O_1$  и  $O_3$ , а код 20.00  $\pm$  3.730% пилића огледне групе  $O_2$  (Табела 5.). Изолацијом *Salmonella Enteritidis* из

клоакалних брисева пилића, 2. дана живота, применом индиректне методе изолације, није утврђена статистички значајна разлика између огледних група пилића.

Бактериолошким испитивањем клоакалних брисева пилића огледних група, 3. дана живота, применом директне методе изолације, није изолована *Salmonella* Enteritidis код пилића огледне групе  $O_3$ , а изолована је код  $10.00 \pm 2.797\%$  пилића огледне групе  $O_1$  и код  $20.00 \pm 3.730\%$  пилића огледне групе  $O_2$  (Табела 5.). Бактериолошким испитивањем клоакалних брисева пилића огледних група, 3. дана живота, применом индиректне методе изолације, изолована је *Salmonella* Enteritidis код  $50.00 \pm 4.663\%$  пилића огледне групе  $O_1$ , код  $30.00 \pm 4.273\%$  пилића огледне групе  $O_2$  и код  $40.00 \pm 4.568\%$  пилића огледне групе  $O_3$  (Табела 5.). Изолацијом *Salmonella* Enteritidis из клоакалних брисева пилића, 3. дана живота, применом директне методе изолације, утврђена је статистички значајна разлика између огледних група  $O_1$  и  $O_2$  за ниво вероватноће  $p < 0.05$ . Изолацијом *Salmonella* Enteritidis из клоакалних брисева пилића, 3. дана живота, применом индиректне методе изолације, утврђена је статистички значајна разлика између огледних група  $O_1$  и  $O_2$  за ниво вероватноће  $p < 0.01$ , док статистички значајна разлика није утврђена између огледних група  $O_1$  и  $O_3$  и између огледних група  $O_2$  и  $O_3$ .

Бактериолошким испитивањем клоакалних брисева пилића огледних група, 4. дана живота, применом директне методе изолације, није изолована *Salmonella* Enteritidis код пилића огледне групе  $O_3$ , док је код огледних група  $O_1$  и  $O_2$  изолована код  $10.00 \pm 2.797\%$  пилића (Табела 5.). Бактериолошким испитивањем клоакалних брисева пилића огледних група, 4. дана живота, применом индиректне методе изолације, изолована је *Salmonella* Enteritidis код  $30.00 \pm 4.273\%$  пилића огледних група  $O_2$  и  $O_3$ , а код  $40.00 \pm 4.568\%$  пилића огледне групе  $O_1$  (Табела 5.). Изолацијом *Salmonella* Enteritidis из клоакалних брисева пилића, 4. дана живота, применом индиректне методе изолације, није утврђена статистички значајна разлика између огледних група пилића.

#### **Резултати изолације и идентификације *Salmonella* Enteritidis из клоакалних брисева пилића контролне групе $K_1$ , 12., 17. и 22. дана живота**

Бактериолошким испитивањем клоакалних брисева пилића контролне групе  $K_1$ , 12., 17. и 22. дана живота, применом директне и индиректне методе изолације, није изолована *Salmonella* Enteritidis.

#### **Резултати изолације и идентификације *Salmonella* Enteritidis из клоакалних брисева пилића контролне групе $K_2$ , угинулих у току огледа**

Бактериолошким испитивањем клоакалних брисева пилића контролне групе  $K_2$ , угинулих у току огледа, применом директне методе испитивања изолована је *Salmonella* Enteritidis код  $16.66 \pm 3.401\%$  пилића, а применом индиректне методе испитивања код  $66.64 \pm 4.304\%$  пилића.



### Резултати изолације и идентификације *Salmonella Enteritidis* из клоакалних брисева пилића контролне групе $K_2$ , 12., 17. и 22. дана живота

Бактериолошким испитивањем клоакалних брисева пилића контролне групе  $K_2$ , 12., 17. и 22. дана живота, применом директне и индиректне методе изолације *Salmonella Enteritidis*, добијени су резултати како је приказано у Табели 6.

**Табела 6.** Процент изолације *Salmonella Enteritidis* из клоакалних брисева пилића контролне групе  $K_2$ , 12., 17. и 22. дана живота применом директне и индиректне методе изолације

Дан	Метода изолације	% изолације $\pm S_p$
12.	Директна	30.00 $\pm$ 4.273
	Индиректна	70.00 $\pm$ 4.273
17.	Директна	20.00 $\pm$ 3.730
	Индиректна	70.00 $\pm$ 4.273
22.	Директна	20.00 $\pm$ 3.730
	Индиректна	60.00 $\pm$ 4.568

Бактериолошким испитивањем клоакалних брисева пилића контролне групе  $K_2$ , у 12. дану живота, применом директне методе изолације, изолована је *Salmonella Enteritidis* код 30.00  $\pm$  4.273% пилића а применом индиректне методе изолације код 70.00  $\pm$  4.273% пилића (Табела 6.).

Бактериолошким испитивањем клоакалних брисева пилића контролне групе  $K_2$ , у 17. дану живота, применом директне методе изолације, изолована је *Salmonella Enteritidis* код 20.00  $\pm$  3.730% пилића а применом индиректне методе изолације код 70.00  $\pm$  4.273% пилића (Табела 6.).

Бактериолошким испитивањем клоакалних брисева пилића контролне групе  $K_2$ , у 22. дану живота, применом директне методе изолације, изолована је *Salmonella Enteritidis* код 20.00  $\pm$  3.730% пилића а применом индиректне методе изолације код 60.00  $\pm$  4.568% пилића (Табела 6.).

### Резултати изолације и идентификације *Salmonella Enteritidis* из клоакалних брисева пилића огледних група $O_1$ , $O_2$ и $O_3$ , 12., 17. и 22. дана живота

Бактериолошким испитивањем клоакалних брисева пилића огледних група  $O_1$ ,  $O_2$  и  $O_3$ , 12., 17. и 22. дана живота, применом директне и индиректне методе изолације *Salmonella Enteritidis*, добијени су резултати како је приказано у Табели 7.

**Табела 7.** Процент изолације *Salmonella* Enteritidis из клоакалних брисева пилића огледних група, 12., 17. и 22. дана живота применом директне и индиректне методе изолације

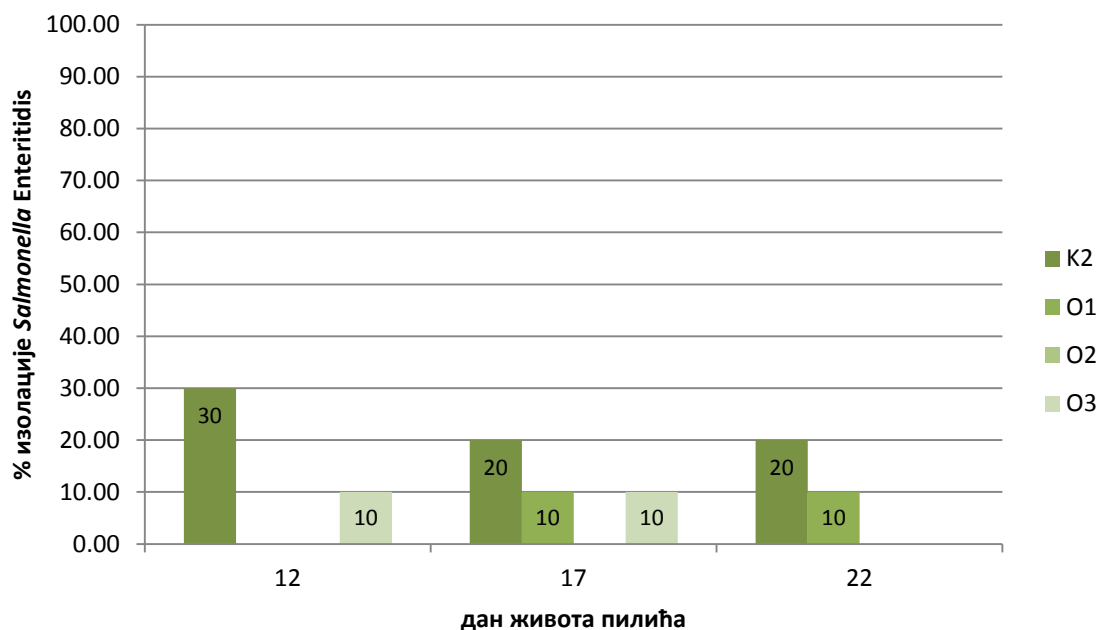
Дан	Метода изолације	% изолације $\pm S_p$		
		Огледна група $O_1$	Огледна група $O_2$	Огледна група $O_3$
12.	Директна	-	-	10.00 $\pm$ 2.797
	Индиректна	50.00 $\pm$ 4.663	70.00 $\pm$ 4.273	60.00 $\pm$ 4.568
17.	Директна	10.00 $\pm$ 2.797	-	10.00 $\pm$ 2.797
	Индиректна	40.00 $\pm$ 4.568	40.00 $\pm$ 4.568	50.00 $\pm$ 4.663
22.	Директна	10.00 $\pm$ 2.797	-	-
	Индиректна	20.00 $\pm$ 3.730	10.00 $\pm$ 2.797	20.00 $\pm$ 3.730

Бактериолошким испитивањем клоакалних брисева пилића огледних група у 12. дану живота, применом директне методе изолације, није изолована *Salmonella* Enteritidis код пилића огледних група  $O_1$  и  $O_2$ , док је код огледне групе  $O_3$  изолована код 10.00  $\pm$  2.797% пилића (Табела 7.). Бактериолошким испитивањем клоакалних брисева пилића огледних група у 12. дану живота, применом индиректне методе изолације, изолована је *Salmonella* Enteritidis код 50.00  $\pm$  4.663% пилића огледне групе  $O_1$ , код 70.00  $\pm$  4.273% пилића огледне групе  $O_2$  и код 60.00  $\pm$  4.568% пилића огледне групе  $O_3$  (Табела 7.). Изолацијом *Salmonella* Enteritidis из клоакалних брисева пилића, 12. дана живота, применом индиректне методе изолације, утврђена је статистички значајна разлика између огледних група  $O_1$  и  $O_2$  за ниво вероватноће  $p < 0.01$ , док статистички значајна разлика није утврђена између огледних група  $O_1$  и  $O_3$  и између огледних група  $O_2$  и  $O_3$ .

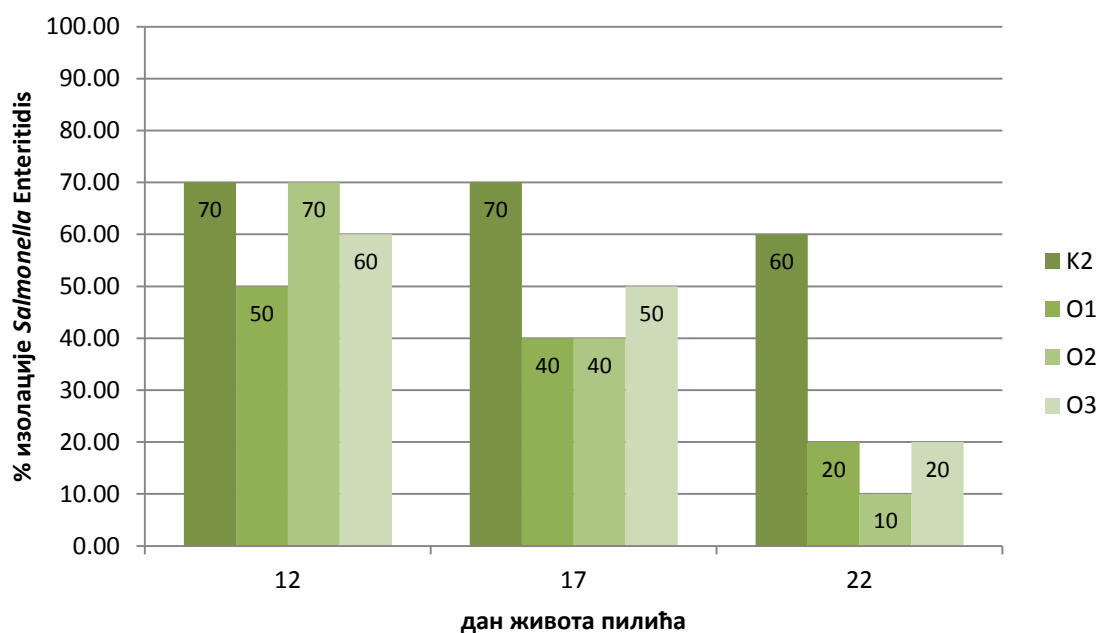
Бактериолошким испитивањем клоакалних брисева пилића огледних група у 17. дану живота, применом директне методе изолације, није изолована *Salmonella* Enteritidis код пилића огледне групе  $O_2$ , док је код огледних група  $O_1$  и  $O_3$  изолована код 10.00  $\pm$  2.797% пилића (Табела 7.). Бактериолошким испитивањем клоакалних брисева пилића огледних група у 17. дану живота, применом индиректне методе изолације, изолована је *Salmonella* Enteritidis код 40.00  $\pm$  4.568% пилића огледних група  $O_1$  и  $O_2$ , а код 50.00  $\pm$  4.663% пилића огледне групе  $O_3$  (Табела 7.). Изолацијом *Salmonella* Enteritidis из клоакалних брисева пилића, 17. дана живота, применом индиректне методе изолације, није утврђена статистички значајна разлика између огледних група пилића.

Бактериолошким испитивањем клоакалних брисева пилића огледних група у 22. дану живота, применом директне методе изолације, није изолована *Salmonella* Enteritidis код пилића огледних група  $O_2$  и  $O_3$ , док је код огледне групе  $O_1$  изолована код 10.00  $\pm$  2.797% пилића (Табела 7.). Бактериолошким испитивањем клоакалних брисева пилића огледних група у 22. дану живота, применом индиректне методе изолације, изолована је *Salmonella* Enteritidis код 20.00  $\pm$  3.730% пилића огледних група  $O_1$  и  $O_3$ , а код 10.00  $\pm$  2.797% пилића огледне групе  $O_2$  (Табела 7.). Изолацијом *Salmonella* Enteritidis из клоакалних брисева пилића, 22. дана живота, применом индиректне методе изолације, утврђена је статистички значајна разлика између огледне групе  $O_2$  и огледних група  $O_1$  и  $O_3$  за ниво вероватноће  $p < 0.05$ .

Упоредни приказ бактериолошког испитивања клоакалних брисева пилића контролне групе  $K_2$  и огледних група, 12., 17. и 22. дана живота, применом директне и индиректне методе изолације *Salmonella* Enteritidis, дат је у Графикону 1. и 2.



**Графикон 1.** Упоредни приказ бактериолошког испитивања клоакалних брисева пилића контролне групе  $K_2$  и огледних група, 12., 17. и 22. дана живота, применом директне методе изолације *Salmonella Enteritidis*.



**Графикон 2.** Упоредни приказ бактериолошког испитивања клоакалних брисева пилића контролне групе  $K_2$  и огледних група, 12., 17. и 22. дана живота, применом индиректне методе изолације *Salmonella Enteritidis*.

Изолацијом *Salmonella Enteritidis* из клоакалних брисева пилића контролне групе  $K_2$  и огледних група, 12. дана живота, применом директне методе изолације, утврђена је статистички значајна разлика између контролне групе  $K_2$  и огледне групе  $O_3$  за ниво вероватноће  $p < 0.01$ . Изолацијом *Salmonella Enteritidis* из клоакалних брисева пилића

контролне групе  $K_2$  и огледних група, 12. дана живота, применом индиректне методе изолације, утврђена је статистички значајна разлика између контролне групе  $K_2$  и огледне групе  $O_1$  за ниво вероватноће  $p < 0.01$ , док статистички значајна разлика није утврђена између контролне групе  $K_2$  и огледне групе  $O_3$ .

Изолацијом *Salmonella* Enteritidis из клоакалних брисева пилића контролне групе  $K_2$  и огледних група, 17. дана живота, применом директне методе изолације, утврђена је статистички значајна разлика између контролне групе  $K_2$  и огледних група  $O_1$  и  $O_3$  за ниво вероватноће  $p < 0.05$ . Изолацијом *Salmonella* Enteritidis из клоакалних брисева пилића контролне групе  $K_2$  и огледних група, 17. дана живота, применом индиректне методе изолације, утврђена је статистички значајна разлика између контролне групе  $K_2$  и огледних група  $O_1$  и  $O_2$  за ниво вероватноће  $p < 0.001$ , а између контролне групе  $K_2$  и огледне групе  $O_3$  за ниво вероватноће  $p < 0.01$ .

Изолацијом *Salmonella* Enteritidis из клоакалних брисева пилића контролне групе  $K_2$  и огледних група, 22. дана живота, применом директне методе изолације, утврђена је статистички значајна разлика између контролне групе  $K_2$  и огледне групе  $O_1$  за ниво вероватноће  $p < 0.05$ . Изолацијом *Salmonella* Enteritidis из клоакалних брисева пилића контролне групе  $K_2$  и огледних група, 22. дана живота, применом индиректне методе изолације, утврђена је статистички значајна разлика између контролне групе  $K_2$  и огледних група за ниво вероватноће  $p < 0.001$ .

#### 5.4. Резултати изолације и идентификације *Salmonella* Enteritidis из различитих органа пилића

##### Резултати изолације и идентификације *Salmonella* Enteritidis из органа (слезина, јетра и цекуми) пилића контролне групе $K_1$ , 12., 17. и 22. дана живота

Бактериолошким испитивањем органа (слезина, јетра и цекуми) пилића контролне групе  $K_1$ , 12., 17. и 22. дана живота, применом директне и индиректне методе изолације, није изолована *Salmonella* Enteritidis.

##### Резултати изолације и идентификације *Salmonella* Enteritidis из органа (слезина, јетра и цекуми) пилића контролне групе $K_2$ , уинулих у току огледа

Бактериолошким испитивањем органа (слезина, јетра и цекуми) пилића контролне групе  $K_2$ , уинулих у току огледа, применом директне и индиректне методе изолације *Salmonella* Enteritidis, добијени су резултати како је приказано у Табели 8.

**Табела 8.** Процент изолације *Salmonella* Enteritidis из различитих органа и клоакалних брисева пилића контролне групе  $K_2$ , уинулих у току трајања огледа, применом директне и индиректне методе изолације

Орган	Метода изолације	% изолације $\pm S_p$
Слезина	Директна	-
	Индиректна	50.00 $\pm$ 4.564
Јетра	Директна	-
	Индиректна	50.00 $\pm$ 4.564
Цекум	Директна	33.32 $\pm$ 4.395
	Индиректна	66.64 $\pm$ 4.304

Бактериолошким испитивањем слезине и јетре пилића контролне групе  $K_2$ , уинулих у току огледа, применом директне методе испитивања, није изолована *Salmonella* Enteritidis, док је из цекума изолована код  $33.32 \pm 4.395\%$  пилића (Табела 8.). Бактериолошким испитивањем слезине и јетре пилића контролне групе  $K_2$ , уинулих у току огледа, применом индиректне методе испитивања, изолована је *Salmonella* Enteritidis код  $50.00 \pm 4.564\%$  пилића док је из цекума изолована код  $66.64 \pm 4.304\%$  пилића (Табела 8.).

### Резултати изолације и идентификације *Salmonella* Enteritidis из органа (слезина, јетра и цекуми) пилића контролне групе $K_2$ , 12., 17. и 22. дана живота

Бактериолошким испитивањем органа (слезина, јетра и цекуми) пилића контролне групе  $K_2$ , 12., 17. и 22. дана живота, применом директне и индиректне методе изолације *Salmonella* Enteritidis, добијени су резултати како је приказано у Табели 9.

**Табела 9.** Процент изолације *Salmonella* Enteritidis из различитих органа пилића контролне групе  $K_2$ , 12., 17. и 22. дана живота применом директне и индиректне методе изолације

Орган	Метода изолације	% изолације $\pm S_p$		
		12. дан	17. дан	22. дан
Слезина	Директна	-	$16.66 \pm 3.401$	-
	Индиректна	$50.00 \pm 4.564$	$50.00 \pm 4.564$	$33.32 \pm 4.395$
Јетра	Директна	-	-	-
	Индиректна	$66.64 \pm 4.304$	$66.64 \pm 4.304$	$50.00 \pm 4.564$
Цекум	Директна	$33.32 \pm 4.395$	$16.66 \pm 3.401$	$16.66 \pm 3.401$
	Индиректна	$66.64 \pm 4.304$	$66.64 \pm 4.304$	$66.64 \pm 4.304$

Бактериолошким испитивањем слезине и јетре пилића контролне групе  $K_2$  у 12. дану живота, применом директне методе изолације, није изолована *Salmonella* Enteritidis, док је из цекума изолована код  $33.32 \pm 4.395\%$  пилића (Табела 9.). Бактериолошким испитивањем слезине пилића контролне групе  $K_2$  у 12. дану живота, применом индиректне методе изолације, изолована је *Salmonella* Enteritidis код  $50.00 \pm 4.564\%$  пилића, док је из јетре и цекума изолована код  $66.64 \pm 4.304\%$  пилића (Табела 9.).

Бактериолошким испитивањем јетре пилића контролне групе  $K_2$  у 17. дану живота, применом директне методе изолације, није изолована *Salmonella* Enteritidis, док је из слезине и цекума изолована код  $16.66 \pm 3.401\%$  пилића (Табела 9.). Бактериолошким испитивањем слезине пилића контролне групе  $K_2$  у 17. дану живота, применом индиректне методе изолације, изолована је *Salmonella* Enteritidis код  $50.00 \pm 4.564\%$  пилића, док је из јетре и цекума изолована код  $66.64 \pm 4.304\%$  пилића (Табела 9.).

Бактериолошким испитивањем слезине и јетре пилића контролне групе  $K_2$  у 22. дану живота, применом директне методе изолације, није изолована *Salmonella* Enteritidis, док је из цекума изолована код  $16.66 \pm 3.401\%$  пилића (Табела 9.). Бактериолошким испитивањем слезине пилића контролне групе  $K_2$  у 22. дану живота, применом индиректне методе изолације, изолована је *Salmonella* Enteritidis код  $33.32 \pm 4.395\%$  пилића, из јетре код  $50.00 \pm 4.564\%$  пилића и из цекума код  $66.64 \pm 4.304\%$  пилића (Табела 9.).

### Резултати изолације и идентификације *Salmonella Enteritidis* из органа (слезина, јетра и цекуми) пилића огледних група $O_1$ , $O_2$ и $O_3$ , у 12. дану живота

Бактериолошким испитивањем органа (слезина, јетра и цекуми) пилића огледних група  $O_1$ ,  $O_2$  и  $O_3$ , у 12. дану живота, применом директне и индиректне методе изолације *Salmonella Enteritidis*, добијени су резултати како је приказано у Табели 10.

**Табела 10.** Процент изолације *Salmonella Enteritidis* из различитих органа пилића огледних група у 12. дану живота применом директне и индиректне методе изолације

Орган	Метода изолације	% изолације $\pm S_p$		
		Огледна група $O_1$	Огледна група $O_2$	Огледна група $O_3$
Слезина	Директна	-	-	-
	Индиректна	-	-	16.66 $\pm$ 3.401
Јетра	Директна	-	-	-
	Индиректна	16.66 $\pm$ 3.401	16.66 $\pm$ 3.401	16.66 $\pm$ 3.401
Цекум	Директна	-	16.66 $\pm$ 3.401	16.66 $\pm$ 3.401
	Индиректна	50.00 $\pm$ 4.564	66.64 $\pm$ 4.304	50.00 $\pm$ 4.564

Бактериолошким испитивањем слезине пилића огледних група у 12. дану живота, применом директне методе изолације, није изолована *Salmonella Enteritidis* (Табела 10.). Бактериолошким испитивањем слезине пилића огледних група у 12. дану живота, применом индиректне методе изолације, није изолована *Salmonella Enteritidis* код пилића огледних група  $O_1$  и  $O_2$ , док је код огледне групе  $O_3$  изолована код 16.66  $\pm$  3.401% пилића (Табела 10.).

Бактериолошким испитивањем јетре пилића огледних група у 12. дану живота, применом директне методе изолације, није изолована *Salmonella Enteritidis* (Табела 10.). Бактериолошким испитивањем јетре пилића огледних група у 12. дану живота, применом индиректне методе изолације, изолована је *Salmonella Enteritidis* код 16.66  $\pm$  3.401% пилића (Табела 10.).

Бактериолошким испитивањем цекума пилића огледних група у 12. дану живота, применом директне методе изолације, није изолована *Salmonella Enteritidis* код пилића огледне групе  $O_1$ , док је код огледних група  $O_2$  и  $O_3$  изолована код 16.66  $\pm$  3.401% пилића (Табела 10.). Бактериолошким испитивањем цекума пилића огледних група у 12. дану живота, применом индиректне методе изолације, изолована је *Salmonella Enteritidis* код 50.00  $\pm$  4.564% пилића огледних група  $O_1$  и  $O_3$ , а код 66.64  $\pm$  4.304% пилића огледне групе  $O_2$  (Табела 10.). Изолацијом *Salmonella Enteritidis* из цекума пилића, 12. дана живота, применом индиректне методе изолације, утврђена је статистички значајна разлика између огледне групе  $O_2$  и огледних група  $O_1$  и  $O_3$  за ниво вероватноће  $p < 0.01$ .

### Резултати изолације и идентификације *Salmonella Enteritidis* из органа (слезина, јетра и цекуми) пилића огледних група $O_1$ , $O_2$ и $O_3$ , у 17. дану живота

Бактериолошким испитивањем органа (слезина, јетра и цекуми) пилића огледних група  $O_1$ ,  $O_2$  и  $O_3$ , у 17. дану живота, применом директне и индиректне методе изолације *Salmonella Enteritidis*, добијени су резултати како је приказано у Табели 11.

**Табела 11.** Процент изолације *Salmonella* Enteritidis из различитих органа пилића огледних група у 17. дану живота применом директне и индиректне методе изолације

Орган	Метода изолације	% изолације $\pm S_p$		
		Огледна група $O_1$	Огледна група $O_2$	Огледна група $O_3$
Слезина	Директна	-	-	-
	Индиректна	-	-	-
Јетра	Директна	-	-	-
	Индиректна	-	16.66 $\pm$ 3.401	16.66 $\pm$ 3.401
Цекум	Директна	-	-	16.66 $\pm$ 3.401
	Индиректна	33.32 $\pm$ 4.395	33.32 $\pm$ 4.395	50.00 $\pm$ 4.564

Бактериолошким испитивањем слезине пилића огледних група у 17. дану живота, применом директне и индиректне методе изолације, није изолована *Salmonella* Enteritidis (Табела 11.).

Бактериолошким испитивањем јетре пилића огледних група у 17. дану живота, применом директне методе изолације, није изолована *Salmonella* Enteritidis (Табела 8.). Бактериолошким испитивањем јетре пилића огледних група у 17. дану живота, применом индиректне методе изолације, није изолована *Salmonella* Enteritidis код пилића огледне групе  $O_1$ , док је код огледних група  $O_2$  и  $O_3$  изолована код 16.66  $\pm$  3.401% пилића (Табела 11.).

Бактериолошким испитивањем цекума пилића огледних група у 17. дану живота, применом директне методе изолације, није изолована *Salmonella* Enteritidis код пилића огледних група  $O_1$  и  $O_2$ , док је код огледне групе  $O_3$  изолована код 16.66  $\pm$  3.401% пилића (Табела 11.). Бактериолошким испитивањем цекума пилића огледних група у 17. дану живота, применом индиректне методе изолације, изолована је *Salmonella* Enteritidis код 33.32  $\pm$  4.395% пилића огледних група  $O_1$  и  $O_2$ , а код 50.00  $\pm$  4.564% пилића огледне групе  $O_3$  (Табела 11.). Изолацијом *Salmonella* Enteritidis из цекума пилића, 17. дана живота, применом индиректне методе изолације, утврђена је статистички значајна разлика између огледне групе  $O_3$  и огледних група  $O_1$  и  $O_2$  за ниво вероватноће  $p < 0.01$ .

### Резултати изолације и идентификације *Salmonella* Enteritidis из органа (слезина, јетра и цекуми) пилића огледних група $O_1$ , $O_2$ и $O_3$ , у 22. дану живота

Бактериолошким испитивањем органа (слезина, јетра и цекуми) пилића огледних група  $O_1$ ,  $O_2$  и  $O_3$ , у 22. дану живота, применом директне и индиректне методе изолације *Salmonella* Enteritidis, добијени су резултати како је приказано у Табели 12.

**Табела 12.** Процент изолације *Salmonella* Enteritidis из различитих органа пилића огледних група у 22. дану живота применом директне и индиректне методе изолације

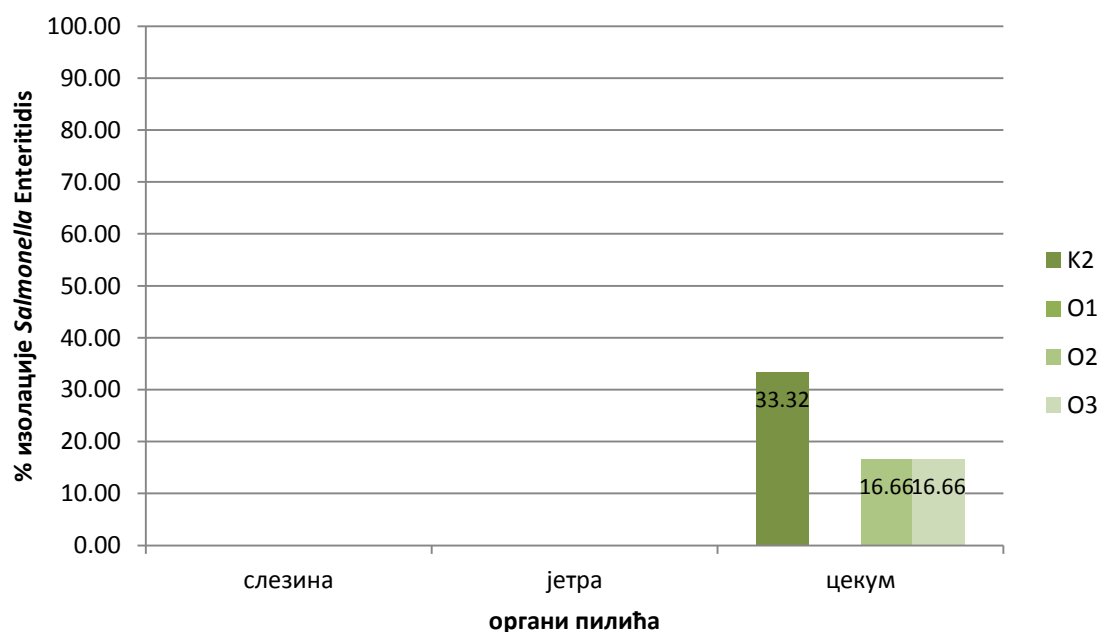
Орган	Метода изолације	% изолације ± S <sub>p</sub>		
		Огледна група O <sub>1</sub>	Огледна група O <sub>2</sub>	Огледна група O <sub>3</sub>
Слезина	Директна	-	-	-
	Индиректна	-	-	-
Јетра	Директна	-	-	-
	Индиректна	-	-	-
Цекум	Директна	-	16.66 ± 3.401	-
	Индиректна	16.66 ± 3.401	16.66 ± 3.401	16.66 ± 3.401

Бактериолошким испитивањем слезине пилића огледних група у 22. дану живота, применом директне и индиректне методе изолације, није изолована *Salmonella* Enteritidis (Табела 12.).

Бактериолошким испитивањем јетре пилића огледних група у 22. дану живота, применом директне и индиректне методе изолације, није изолована *Salmonella* Enteritidis (Табела 12.).

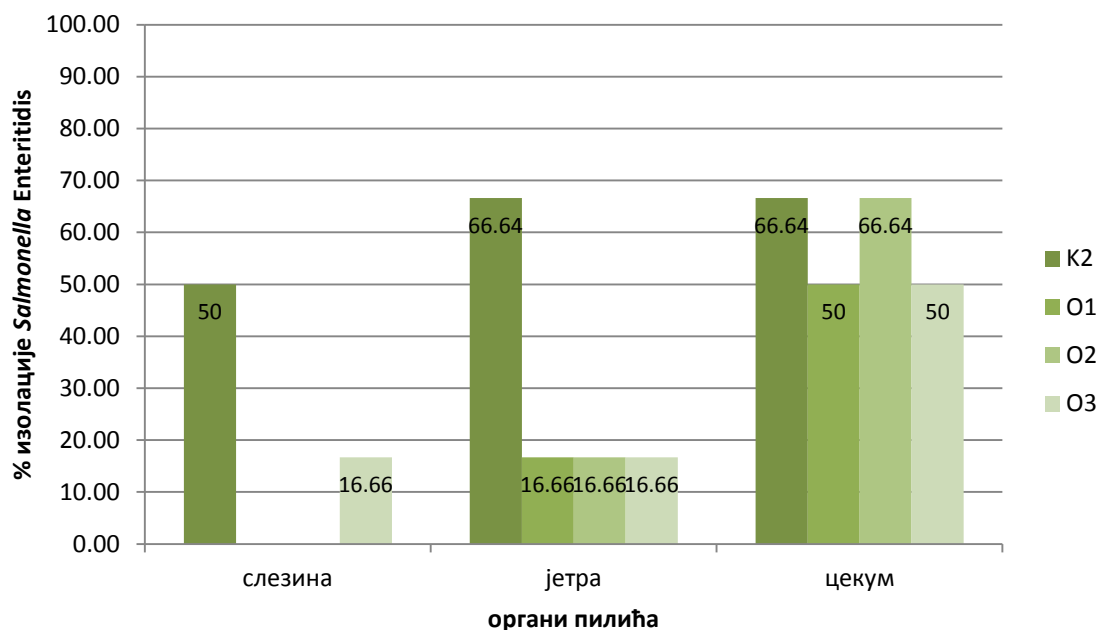
Бактериолошким испитивањем цекума пилића огледних група у 22. дану живота, применом директне методе изолације, није изолована *Salmonella* Enteritidis код пилића огледних група O<sub>1</sub> и O<sub>3</sub>, док је код огледне групе O<sub>2</sub> изолована код 16.66 ± 3.401% пилића (Табела 12.). Бактериолошким испитивањем цекума пилића огледних група у 22. дану живота, применом индиректне методе изолације, изолована је *Salmonella* Enteritidis код 16.66 ± 3.401% пилића (Табела 12.).

Упоредни приказ бактериолошког испитивања органа (слезина, јетра и цекуми) пилића контролне групе K<sub>2</sub> и огледних група, 12. дана живота, применом директне и индиректне методе изолације *Salmonella* Enteritidis, дат је у Графикону 3 и 4.



**Графикон 3.** Упоредни приказ бактериолошког испитивања органа (слезина, јетра и цекуми) пилића контролне групе K<sub>2</sub> и огледних група, 12. дана живота, применом директне методе изолације *Salmonella* Enteritidis.





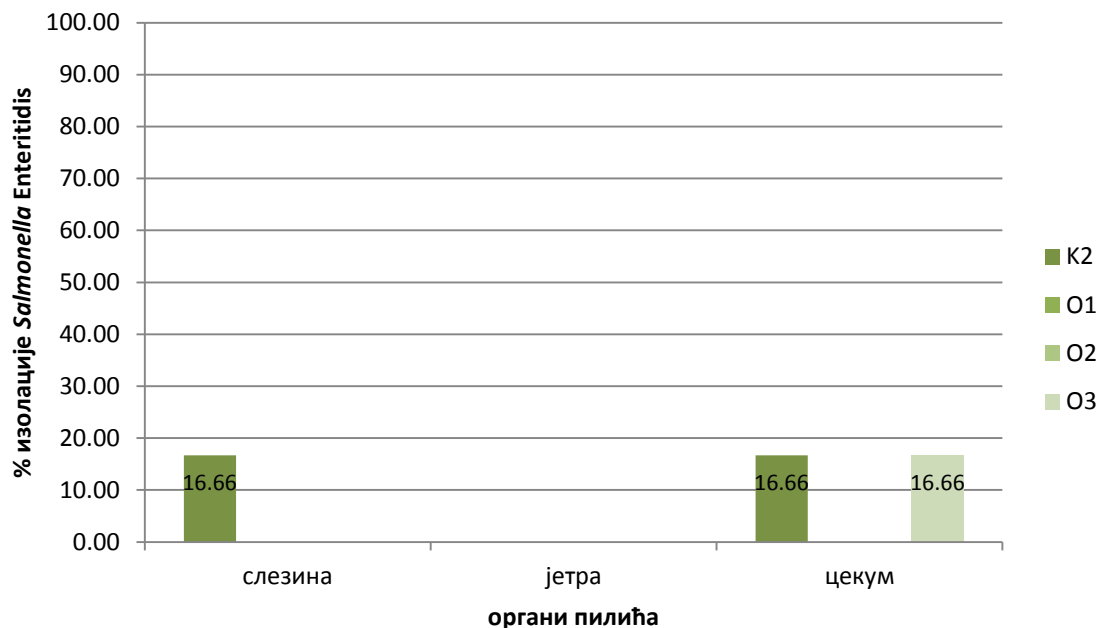
**Графикон 4.** Упоредни приказ бактериолошког испитивања органа (слезина, јетра и цекуми) пилића контролне групе  $K_2$  и огледних група, 12. дана живота, применом индиректне методе изолације *Salmonella Enteritidis*.

Изолацијом *Salmonella Enteritidis* из слезине пилића контролне групе  $K_2$  и огледних група, 12. дана живота, применом индиректне методе изолације, утврђена је статистички значајна разлика између контролне групе  $K_2$  и огледне групе  $O_3$  за ниво вероватноће  $p < 0.001$ .

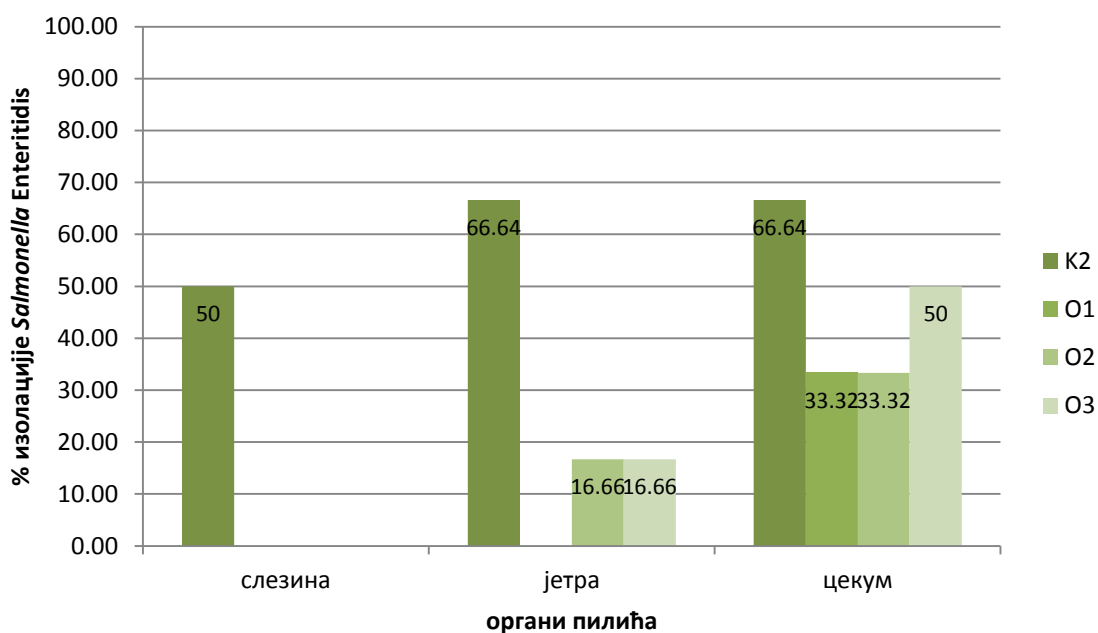
Изолацијом *Salmonella Enteritidis* из јетре пилића контролне групе  $K_2$  и огледних група, 12. дана живота, применом индиректне методе изолације, утврђена је статистички значајна разлика између контролне групе  $K_2$  и огледних група за ниво вероватноће  $p < 0.001$ .

Изолацијом *Salmonella Enteritidis* из цекума пилића контролне групе  $K_2$  и огледних група, 12. дана живота, применом директне методе изолације, утврђена је статистички значајна разлика између контролне групе  $K_2$  и огледних група  $O_2$  и  $O_3$  за ниво вероватноће  $p < 0.01$ . Изолацијом *Salmonella Enteritidis* из цекума пилића контролне групе  $K_2$  и огледних група, 12. дана живота, применом индиректне методе изолације, утврђена је статистички значајна разлика између контролне групе  $K_2$  и огледних група  $O_1$  и  $O_3$  за ниво вероватноће  $p < 0.01$ .

Упоредни приказ бактериолошког испитивања органа (слезина, јетра и цекуми) пилића контролне групе  $K_2$  и огледних група, 17. дана живота, применом директне и индиректне методе изолације *Salmonella Enteritidis*, дат је у Графикону 5 и 6.



**Графикон 5.** Упоредни приказ бактериолошког испитивања органа (слезина, јетра и цекуми) пилића контролне групе  $K_2$  и огледних група, 17. дана живота, применом директне методе изолације *Salmonella Enteritidis*.

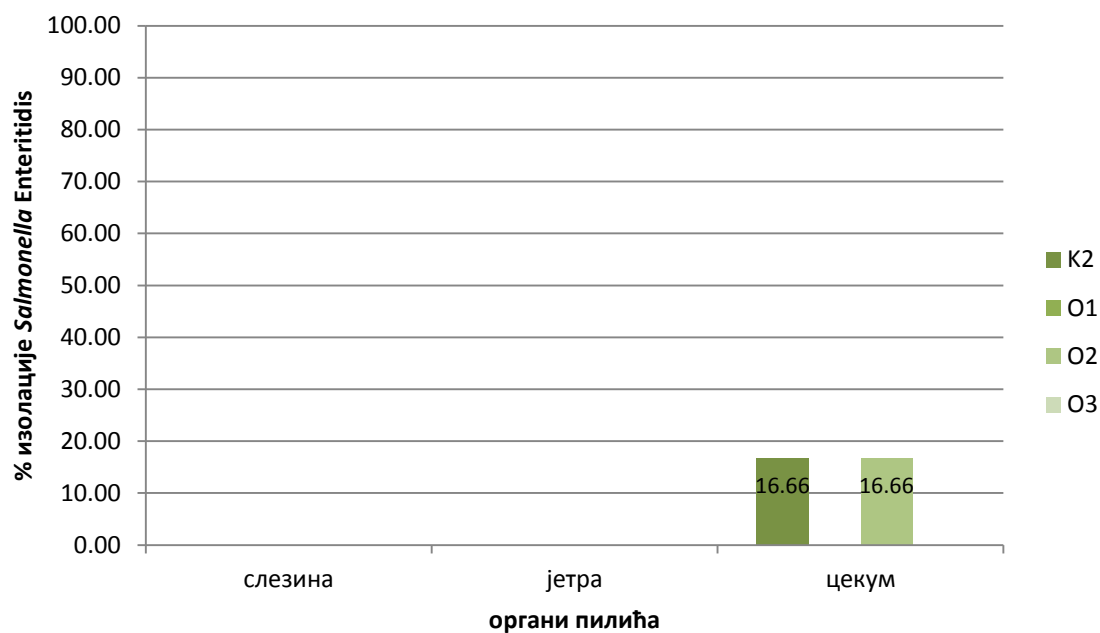


**Графикон 6.** Упоредни приказ бактериолошког испитивања органа (слезина, јетра и цекуми) пилића контролне групе  $K_2$  и огледних група, 17. дана живота, применом индиректне методе изолације *Salmonella Enteritidis*.

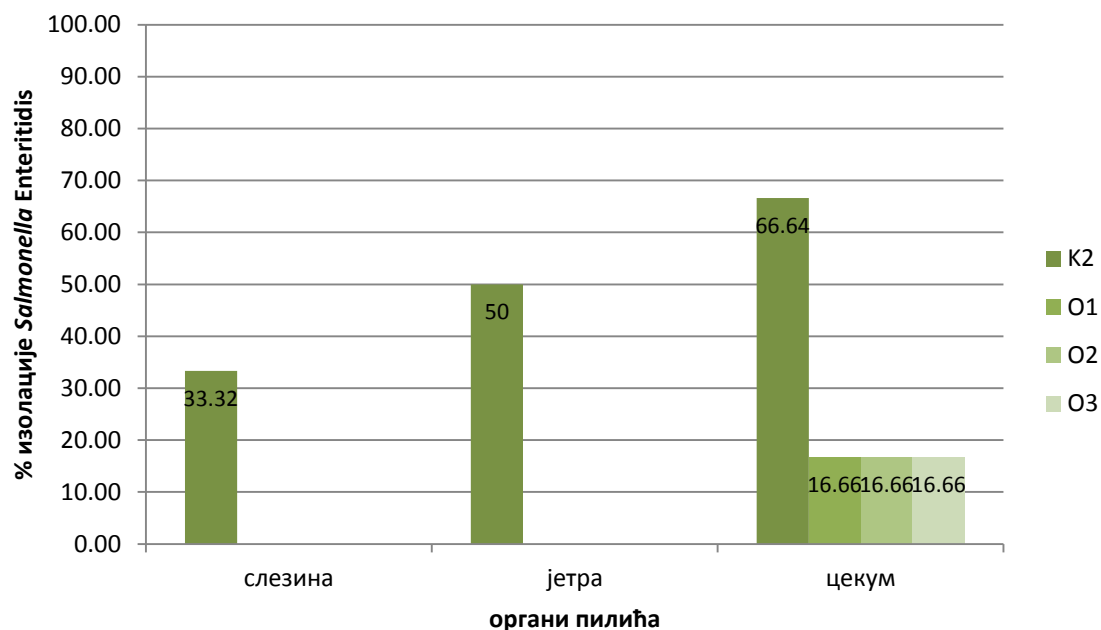
Изолацијом *Salmonella Enteritidis* из јетре пилића контролне групе  $K_2$  и огледних група, 17. дана живота, применом индиректне методе изолације, утврђена је статистички значајна разлика између контролне групе  $K_2$  и огледних група  $O_2$  и  $O_3$  за ниво вероватноће  $p < 0.001$ .

Изолацијом *Salmonella* Enteritidis из цекума пилића контролне групе  $K_2$  и огледних група, 17. дана живота, применом индиректне методе изолације, утврђена је статистички значајна разлика између контролне групе  $K_2$  и огледних група  $O_1$  и  $O_2$  за ниво вероватноће  $p < 0.001$  а између контролне групе  $K_2$  и огледне групе  $O_3$  за ниво вероватноће  $p < 0.01$ .

Упоредни приказ бактериолошког испитивања органа (слезина, јетра и цекуми) пилића контролне групе  $K_2$  и огледних група, 22. дана живота, применом директне и индиректне методе изолације *Salmonella* Enteritidis, дат је у Графикону 7 и 8.



**Графикон 7.** Упоредни приказ бактериолошког испитивања органа (слезина, јетра и цекуми) пилића контролне групе  $K_2$  и огледних група, 22. дана живота, применом директне методе изолације *Salmonella* Enteritidis.



**Графикон 8.** Упоредни приказ бактериолошког испитивања органа (слезина, јетра и цекуми) пилића контролне групе  $K_2$  и огледних група, 22. дана живота, применом индиректне методе изолације *Salmonella Enteritidis*.

Изолацијом *Salmonella Enteritidis* из цекума пилића контролне групе  $K_2$  и огледних група, 22. дана живота, применом индиректне методе изолације, утврђена је статистички значајна разлика између контролне групе  $K_2$  и огледних група за ниво вероватноће  $p < 0.001$ .

### 5.5. Резултати испитивања присуства антитела на *Salmonella Enteritidis* у крвним серумима пилића ELISA тестом

Серолошким испитивањем крвних серума пилића контролних и огледних група, ELISA тестом, узоркованих 7., 12., 17. и 22. дана живота, није утврђено присуство антитела на *Salmonella Enteritidis*.

## 6. ДИСКУСИЈА

Током целог периода трајања огледа, праћењем општег стања пилића, пилићи контролне групе  $K_1$  и огледних група  $O_1$ ,  $O_2$  и  $O_3$ , били су клинички здрави, те код пилића ових група нису запажене промене које би указивале на заостајање у расту и промене у изгледу и понашању. У контролној групи  $K_1$  и у огледној групи  $O_3$  није било угинућа пилића, док су у огледној групи  $O_1$  угинула укупно четири пилета а у огледној групи  $O_2$  два пилета. Приликом обдукције, код пет пилића утврђено је присуство наслага урата у уретерима, перикарду и на јетри, а код једног пилета огледне групе  $O_1$ , мерењем телесне масе и поређењем са просечном телесном масом пилића ове групе у седмом дану живота (82.3g у односу на 160.52g), утврђено је да је реч о шкарт пилету. Бактериолошким испитивањем органа (слезина, јетра и цекуми) и клоакалних брисева пилића огледних група  $O_1$  и  $O_2$ , угинулих у току огледа, директном и индиректном методом изолације, није изолована *Salmonella* Enteritidis. Праћењем општег стања пилића контролне групе  $K_2$ , утврђене су промене у здравственом стању неколико дана након вештачке инфекције *Salmonella* Enteritidis. Запажена је воденаста пенушава дијареја светло смеђе боје, смањено узимање хране, повећана жеђ, блага депресија и веома влажна простирка од пиљевине, до којих налаза су дошли и **Desmidt и сар., 1997.** У контролној групи  $K_2$  морталитет је био знатно изнад технолошких норматива и износио 12%. Угинуло је 6 пилића, код којих су приликом обдукције утврђене увећане јетре и слезине, нересорбоване жуманчане кесе и фибринозни перикардитис, о чему извештавају **Barrow, 1991., Gorham и сар., 1994. и Padron, 1990.** Бактериолошким испитивањем органа (слезина, јетра и цекуми) пилића контролне групе  $K_2$  угинулих у току огледа, применом директне и индиректне методе изолације, изолована је *Salmonella* Enteritidis, како је приказано у Табели 5.

Паратифусне салмонеле могу да се преносе вертикално са родитеља на потомство, хоризонтално директно и индиректно и псеудовертикално преко јаја чија је љуска контаминирана салмонелом. Колонизација црева салмонелама и учесталост угинућа код пилића, у директној је корелацији са дозом орално унете салмонеле (**Saif, 2003.**). Колонизација салмонела у цревима је углавном први корак инфективног процеса код орално унетих салмонела, руковођена често са константним излучивањем салмонела изметом (**Barrow и сар., 1987.**). Огледом који је обухватао две групе бројлерских пилића (**Velhner и сар., 2005.**), у групи пилића вештачки инфицираних перорално са  $10^2$ CFU/0.1 ml *Salmonella* Enteritidis првог дана живота, изолована је *Salmonella* Enteritidis из клоакалних брисева код 30% пилића, а 90% код пилића исте групе инфицираних контактом, док је у групи пилића вештачки инфицираних перорално са  $10^4$ CFU/0.1 ml *Salmonella* Enteritidis у старости од три недеље, изолована *Salmonella* Enteritidis из клоакалних брисева код 66% пилића, а 100% код пилића исте групе инфицираних контактом. Бактериолошким испитивањем клоакалних брисева пилића огледних група  $O_1$ ,  $O_2$  и  $O_3$ , 2., 3. и 4. дана живота, применом директне и индиректне методе изолације, утврђено је значајно повећање изолације вакциналне *Salmonella* Enteritidis 3. дана живота у односу на изолацију 2. дана живота, док се проценат изолације није мењао у односу на изолацију 4. дана живота. Може се закључити да је повећање процента изолације настало као резултат поновног пероралног уношења вакциналне *Salmonella* Enteritidis, излучене путем фецеса и њеног умножавања.

Бактериолошким испитивањем органа (слезина, јетра и цекуми) и клоакалних брисева пилића контролне групе  $K_1$ , 12., 17. и 22. дана живота, применом директне и индиректне методе изолације, није изолована *Salmonella* Enteritidis, а серолошким

испитивањем крвних серума пилића, ELISA тестом, узоркованих 7., 12., 17. и 22. дана живота, није утврђено присуство антитела на *Salmonella* Enteritidis, на основу чега се може закључити да током трајања огледа, манипулација са пилићима, осим вакциналне и инфективне *Salmonella* Enteritidis, није довела до уношења у фарму и евентуалне додатне инфекције *Salmonella* Enteritidis.

Бактериолошким испитивањем клоакалних брисева пилића контролне групе  $K_2$ , применом директне методе изолације, изолована је *Salmonella* Enteritidis у 12. дану живота код  $30.00 \pm 4.273\%$  пилића, у 17. дану живота код  $20.00 \pm 3.730\%$  пилића, а у 22. дану живота код  $20.00 \pm 3.730\%$  пилића. Бактериолошким испитивањем клоакалних брисева пилића контролне групе  $K_2$ , применом индиректне методе изолације, изолована је *Salmonella* Enteritidis у 12. дану живота код  $70.00 \pm 4.273\%$  пилића, у 17. дану живота код  $70.00 \pm 4.273\%$  пилића а у 22. дану живота код  $60.00 \pm 4.568\%$  пилића. Добијени резултати, применом индиректне методе изолације *Salmonella* Enteritidis, подударaju се са резултатима које су добили **Velhner и сар., 2005.** код огледне групе пилића вештачки инфицираних са  $10^4$ CFU/0.1 ml *Salmonella* Enteritidis у старости од три недеље. Огледом који је обухватао две групе по 30 бројлерских пилића, вештачки инфицираних малим дозама *Salmonella* Enteritidis у старости од једног дана и три недеље, рађено је бактериолошко испитивање клоакалних брисева пилића током 14 дана од инфекције (**Velhner и сар., 2005.**). У групи пилића вештачки инфицираних перорално са  $10^2$ CFU/0.1 ml *Salmonella* Enteritidis првог дана живота, изолована је *Salmonella* Enteritidis из клоакалних брисева код 30% пилића, а 90% код пилића исте групе, инфицираних контактом. У групи пилића вештачки инфицираних перорално са  $10^4$ CFU/0.1 ml *Salmonella* Enteritidis у старости од три недеље, изолована је *Salmonella* Enteritidis из клоакалних брисева код 66% пилића, а 100% код пилића исте групе, инфицираних контактом. У огледу, који је обухватао три групе пилића слободних од салмонела, које су имале по 100 једнодневних пилића, у трајању од 53 недеље, једна огледна група је храњена храном која је садржавала  $10^8$ CFU *Salmonella* Enteritidis, друга огледна група је храњена храном која је садржавала  $10^8$  *Salmonella* Typhimurium а трећа група је била контролна (**Skov и сар., 2002.**). Бактериолошким испитивањем клоакалних брисева пилића у току прве недеље огледа, број пилића који је излучивао салмонеле фецесом у обе огледне групе износио је 100%. Поредиши добијене резултате са резултатима до којих су дошли **Skov и сар., 2002.**, може се закључити да разлика у проценту изолације зависи од инфективне дозе и дужине периода излагања инфекцији *Salmonella* Enteritidis.

Бактериолошким испитивањем цекума пилића контролне групе  $K_2$  у 12. дану живота, применом директне методе изолације, изолована је *Salmonella* Enteritidis код  $33.32 \pm 4.395\%$  пилића, бактериолошким испитивањем слезине применом индиректне методе изолације, изолована је код  $50.00 \pm 4.564\%$  пилића, док је из јетре и цекума изолована код  $66.64 \pm 4.304\%$  пилића (Табела 6.). Бактериолошким испитивањем слезине и цекума пилића контролне групе  $K_2$  у 17. дану живота, применом директне методе изолације, изолована је *Salmonella* Enteritidis код  $16.66 \pm 3.401\%$  пилића, бактериолошким испитивањем слезине применом индиректне методе изолације, изолована је код  $50.00 \pm 4.564\%$  пилића, док је из јетре и цекума изолована код  $66.64 \pm 4.304\%$  пилића (Табела 6.). Бактериолошким испитивањем цекума пилића контролне групе  $K_2$  у 22. дану живота, применом директне методе изолације, изолована је *Salmonella* Enteritidis код  $16.66 \pm 3.401\%$  пилића, бактериолошким испитивањем слезине применом индиректне методе изолације, изолована је код  $33.32 \pm 4.395\%$  пилића, из јетре код  $50.00 \pm 4.564\%$  пилића и из цекума код  $66.64 \pm 4.304\%$  пилића (Табела 6.). Добијени резултати подударaju се са резултатима до којих су дошли **Velhner и сар., 2005.** у погледу изолације *Salmonella* Enteritidis из цекума, док се

разликују у погледу резултата изолације из јетре на крају огледа. У циљу утврђивања који од узорака је најбољи за изолацију салмонела, узети су клоакални брисеви, цекуми и јетре бројлерских пилића, вештачки инфицираних малим дозама *Salmonella* Enteritidis у старости од једног дана и три недеље (Velhner и сар., 2005.). Резултати јасно указују да је најбољи узорак цекум, обзиром да је салмонела константно изолована из овог органа код пилића инфицираних малим дозама салмонела, током трајања огледа, док у јетрама пилића салмонела није изолована на крају огледа.

Изолацијом *Salmonella* Enteritidis из клоакалних брисева пилића огледних група 12. дана живота, применом индиректне методе изолације, утврђена је статистички значајна разлика између огледних група  $O_1$  и  $O_2$  за ниво вероватноће  $p < 0.01$  а изолацијом из клоакалних брисева 22. дана живота, применом индиректне методе изолације, утврђена је статистички значајна разлика између огледне групе  $O_2$  и огледних група  $O_1$  и  $O_3$  за ниво вероватноће  $p < 0.05$ . Изолацијом *Salmonella* Enteritidis из цекума пилића огледних група 12. дана живота, применом индиректне методе изолације, утврђена је статистички значајна разлика између огледне групе  $O_2$  и огледних група  $O_1$  и  $O_3$  за ниво вероватноће  $p < 0.01$ , а изолацијом из цекума 17. дана живота, применом индиректне методе изолације, утврђена је статистички значајна разлика између огледне групе  $O_3$  и огледних група  $O_1$  и  $O_2$  за ниво вероватноће  $p < 0.01$ . Приликом тумачења утврђених статистички значајних разлика, треба имати у виду да је проценат изолације *Salmonella* Enteritidis из клоакалних брисева пилића огледне групе  $O_2$  у односу на пилиће огледне групе  $O_1$  и  $O_3$  био већи у 12. дану живота а мањи у 22. дану живота, односно да се мењао између огледних група у зависности од дана живота пилића. Такође, проценат изолације *Salmonella* Enteritidis из цекума пилића огледних група мењао се између огледних група у зависности од дана живота пилића. Поред утврђених статистички значајних разлика у изолацији *Salmonella* Enteritidis из клоакалних брисева и цекума пилића између огледних група, утврђене су и статистички значајне разлике између контролне групе  $K_2$  и огледних група пилића, применом директне и индиректне методе изолације. Изолацијом *Salmonella* Enteritidis из клоакалних брисева пилића контролне групе  $K_2$  и огледних група, 12. дана живота, применом директне методе изолације, утврђена је статистички значајна разлика између контролне групе  $K_2$  и огледне групе  $O_3$  за ниво вероватноће  $p < 0.01$  а применом индиректне методе изолације, утврђена је статистички значајна разлика између контролне групе  $K_2$  и огледне групе  $O_1$  за ниво вероватноће  $p < 0.01$ . Изолацијом *Salmonella* Enteritidis из клоакалних брисева пилића контролне групе  $K_2$  и огледних група, 17. дана живота, применом директне методе изолације, утврђена је статистички значајна разлика између контролне групе  $K_2$  и огледних група  $O_1$  и  $O_3$  за ниво вероватноће  $p < 0.05$ , применом индиректне методе изолације, утврђена је статистички значајна разлика између контролне групе  $K_2$  и огледних група  $O_1$  и  $O_2$  за ниво вероватноће  $p < 0.001$ , а између контролне групе  $K_2$  и огледне групе  $O_3$  за ниво вероватноће  $p < 0.01$ . Изолацијом *Salmonella* Enteritidis из клоакалних брисева пилића контролне групе  $K_2$  и огледних група, 22. дана живота, применом директне методе изолације, утврђена је статистички значајна разлика између контролне групе  $K_2$  и огледне групе  $O_1$  за ниво вероватноће  $p < 0.05$  а применом индиректне методе изолације, утврђена је статистички значајна разлика између контролне групе  $K_2$  и огледних група за ниво вероватноће  $p < 0.001$ . Изолацијом *Salmonella* Enteritidis из слезине пилића контролне групе  $K_2$  и огледних група, 12. дана живота применом индиректне методе изолације, утврђена је статистички значајна разлика између контролне групе  $K_2$  и огледне групе  $O_3$  за ниво вероватноће  $p < 0.001$ , изолацијом из јетре применом индиректне методе изолације утврђена је статистички значајна разлика између контролне групе  $K_2$  и огледних група за ниво вероватноће  $p < 0.001$ , изолацијом из цекума контролне групе  $K_2$  и огледних група, применом

директне методе изолације утврђена је статистички значајна разлика између контролне групе  $K_2$  и огледних група  $O_2$  и  $O_3$  за ниво вероватноће  $p < 0.01$  а изолацијом из цекума применом индиректне методе изолације утврђена је статистички значајна разлика између контролне групе  $K_2$  и огледних група  $O_1$  и  $O_3$  за ниво вероватноће  $p < 0.01$ . Изолацијом *Salmonella* Enteritidis из јетре пилића контролне групе  $K_2$  и огледних група, 17. дана живота применом индиректне методе изолације, утврђена је статистички значајна разлика између контролне групе  $K_2$  и огледних група  $O_2$  и  $O_3$  за ниво вероватноће  $p < 0.001$ , док је изолацијом из цекума контролне групе  $K_2$  и огледних група применом индиректне методе изолације утврђена статистички значајна разлика између контролне групе  $K_2$  и огледних група  $O_1$  и  $O_2$  за ниво вероватноће  $p < 0.001$  а између контролне групе  $K_2$  и огледне групе  $O_3$  за ниво вероватноће  $p < 0.01$ . Изолацијом *Salmonella* Enteritidis из цекума пилића контролне групе  $K_2$  и огледних група, 22. дана живота, применом индиректне методе изолације, утврђена је статистички значајна разлика између контролне групе  $K_2$  и огледних група за ниво вероватноће  $p < 0.001$ . Иако су утврђене статистички значајне разлике у изолацији *Salmonella* Enteritidis из клоакалних брисева и цекума пилића између огледних група, можемо закључити да су утврђене статистички значајне разлике између контролне групе  $K_2$  и огледних група пилића, применом директне и индиректне методе изолације значајније у тумачењу утицаја пробиотика и пребиотика на поствакцинални одговор пилића, обзиром да је проценат изолације *Salmonella* Enteritidis из клоакалних брисева и цекума пилића огледних група међусобно подједнак у односу на изолацију *Salmonella* Enteritidis из клоакалних брисева и цекума пилића контролне групе  $K_2$ , те да су пилићи огледних група, током трајања огледа, били клинички здрави, без промена општег стања и заостајања у расту.

Бактериолошким испитивањем слезине и јетре пилића огледних група у 12., 17. и 22. дану живота, применом директне и индиректне методе изолације, проценат изолације *Salmonella* Enteritidis није био већи од  $16.66 \pm 3.401\%$ . Изолација *Salmonella* Enteritidis из слезине и јетре пилића огледних група указује да утврђени проценат имунизованих пилића није био заштићен од проласка *Salmonella* Enteritidis у ове органе због кратког периода за стварање имунитета или да пилићи нису имунизовани, односно да је била присутна комбинација ова два фактора. Бактериолошким испитивањем цекума пилића огледних група у 12., 17. и 22. дану живота, применом директне и индиректне методе изолације, проценат изолације *Salmonella* Enteritidis кретао се од  $33.32 \pm 4.395\%$  до  $50.00 \pm 4.564\%$ , са постепеним смањењем процента изолације од 12. до 22. дана живота. Добијени резултати разликују се од резултата до којих је дошао **Barrow, 1997**. Вакцинација живине живом атенуираном вакцином ефикаснија је од вакцинације инактивисаном вакцином, у заштити од инфекције узрокованом са *Salmonella* Enteritidis, која обезбеђује адекватну заштиту и спречава ширење инфекције, с обзиром да узрочник инфекције није излучиван фецесом имунизованих јединки (**Barrow, 1997**). На основу добијених резултата, поставља се питање исправности тврдње коју износи **Barrow, 1997**, да се узрочник инфекције не излучује фецесом имунизованих јединки, обзиром на поновну инфекцију путем фецеса. Такође, може се закључити, да је изолација *Salmonella* Enteritidis из цекума настала као резултат поновног пероралног уношења инфективне *Salmonella* Enteritidis, излучене путем фецеса и њеног умножавања. Разматрајући смањење процента изолације *Salmonella* Enteritidis из цекума пилића огледних група, од 12. до 22. дана живота, може се закључити да је смањење настало заједничким деловањем вакцине односно постепеним развојем имунитета код свих огледних група и деловањем пребиотика и пробиотика код огледних група  $O_2$  и  $O_3$ , што је у складу са резултатима до којих су дошли **BIOMIN Newsletter, 2006**. и **Spring и сар., 2000**. У огледу који је изведен на



једнодневним бројлерским пилићима, који су подељени у две групе од по 18 пилића, од којих је свака имала два понављања, испитиван је утицај Biomin® Poultry5Star на цекалну колонизацију *Salmonella* Enteritidis (**BIOMIN Newsletter, 2006.**). Пилићи су перорално инфицирани у трећем дану старости са 0.1 ml 10<sup>6</sup>CFU/ml *Salmonella enteritidis*. У петом, седмом и десетом дану старости пилићи су жртвовани и садржај цекума је испитиван на присуство *Salmonella* Enteritidis. Третманом са Biomin® Poultry5Star, просечан број *Salmonella* Enteritidis у садржају цекума инфицираних пилића значајно је смањен (испод границе бројања), у поређењу са пилићима који нису добијали Biomin® Poultry5Star. У серији од три огледа, са три дана старим пилићима, орално инфицираним са 10<sup>4</sup>CFU *Salmonella* Typhimurium 29E, пилићи који су добијали 4.000 ppm манан олигосахарида Bio – Mos™, имали су смањену концентрацију *Salmonella* Typhimurium 29E у цекуму, десетог дана старости (**Spring и сар., 2000.**). У другој серији, где је рађена инфекција *Salmonella* Dublin, био је мањи број пилића са салмонелом у цекуму, у десетом дану старости, који су добијали манан олигосахариде. На основу међусобног поређења добијених резултата бактериолошког испитивања клоакалних брисева и органа пилића (слезина, јетра и цекум) огледних група и њиховим поређењем са резултатима бактериолошког испитивања клоакалних брисева и органа пилића (слезина, јетра и цекум) контролне групе K<sub>2</sub>, а имајући у виду опште стање пилића ових група, долазимо до закључка да истовремено кориштење пробиотика или пребиотика уз вакцинацију товних пилића против *Salmonella* Enteritidis живом атенуираном вакцином првог дана живота, није поништило или умањило дејство вакцине на имуни систем пилића и спречило или смањило развој имунитета на салмонелу, с обзиром да кориштени пробиотик и пребиотик делују негативно на патогене бактерије присутне у цревима пилића, а тако и на *Salmonella* Enteritidis.

За бактериолошку дијагностику салмонела, већина стандардних метода изолације и идентификације следи опште шеме које укључују четири утврђена корака (**OIE Manual, 2008.**), и то, неселективно предбогаћење које се употребљава да подстакне раст веома малог броја салмонела или да омогући опоравак оштећених ћелија салмонела, селективно обogaћење које се употребљава да омогући додатно повећање популације салмонела која је потиснута растом осталих организама, постављање на селективне чврсте хранљиве подлоге које се употребљава да се добију изоловане колоније, и биохемијске и серолошке тестове ради потврде њиховог рода и серотипизације. Бактериолошким испитивањем органа (слезина, јетра и цекуми) и клоакалних брисева пилића контролне групе K<sub>2</sub> и огледних група, применом директне и индиректне методе изолације, *Salmonella* Enteritidis је у већем проценту изолована применом индиректне методе изолације, на основу чега се може закључити да се предност даје индиректној методи изолације, која укључује претходно селективно обogaћење популације салмонела на течним селективним хранљивим подлогама.

У циљу утврђивања присуства специфичних антитела против *Salmonella* Enteritidis у узорцима крвних серума вакцинисаних пилића, рађена су упоредна испитивања више комерцијалних китова ELISA теста, чији резултати показују да је компетитивни ELISA тест испољио већу осетљивост у утврђивању присуства специфичних антитела против *Salmonella* Enteritidis (**Barrow, 1997.**). Развијен је ELISA тест за утврђивање антитела на *Salmonella* Enteritidis уз кориштење моноклонских антитела (**Brigmon и сар., 1992.**). Кориштењем теста у испитивањима, која су обухватала и друге бактерије и серотипове *Salmonella* Enteritidis, добијени су резултати који су показали високу специфичност и осетљивост теста. Имајући у виду резултате које су добили **Barrow, 1997.** и **Brigmon и сар., 1992.**, серолошко испитивање крвних серума обављено је компетитивним ELISA тестом произвођача IDEXX Laboratories, (*Salmonella* Enteritidis Antibody Test Kit, Flock Check). Серолошким испитивањем крвних серума пилића контролне групе K<sub>2</sub> и

огледних група, ELISA тестом, узоркованих 7., 12., 17. и 22. дана живота, није утврђено присуство антитела на *Salmonella* Enteritidis. Добијени резултати подударају се са резултатима које су добили **Velhner и сар., 2005.**, а разликују од резултата које су добили **Kles и сар., 1993.** и **McMullin и сар., 1997.** Огледом који је обухватао две групе по 30 бројлерских пилића, вештачки инфицираних малим дозама *Salmonella* Enteritidis у старости од једног дана и три недеље, кориштен је ELISA тест за утврђивање специфичних антитела у узорцима крвних серума (**Velhner и сар., 2005.**). Из једне групе, десет једнодневних пилића је перорално инфицирано са  $10^2$ CFU/0.1 ml *Salmonella* Enteritidis, десет пилића је инфицирано контактом а десет је служило као контрола, док је десет пилића из друге групе, старости три недеље инфицирано перорално са  $10^4$ CFU/0.1 ml *Salmonella* Enteritidis, десет је инфицирано контактом а десет је служило као контрола. Серолошким испитивањем узорака крвних серума пилића ELISA тестом, рађеним 3, 4, 5 и 6 недеља након инфекције једнодневних пилића и 2 и 3 недеље након инфекције пилића старости три недеље, није утврђено присуство специфичних антитела на *Salmonella* Enteritidis код обе групе пилића. Применом ELISA теста у испитивањима крвних серума птица вештачки и природно инфицираних *Salmonella* Typhimurium и *Salmonella* Enteritidis, проценат позитивних јединки кретао се од 15 – 90%, што зависи од инфективне дозе и начина инфицирања, чиме је потврђена могућност кориштења ELISA теста за утврђивање присуства специфичних антитела против салмонела у крвним серумима птица (**Kles и сар., 1993.**). Испитивањем спроведеним у Великој Британији, којим су обухваћене две фарме кока носила, смештене у географски удаљеним крајевима, испитано је 22120 крвних серума, комерцијалним iELISA тестом (**McMullin и сар., 1997.**). На првој фарми утврђено је 3% позитивних узорака крвних серума на присуство специфичних антитела на *Salmonella* Enteritidis, 2.9% неспецифичних узорака, док је 9751 узорак односно 94.2% био негативан. На другој фарми утврђено је 1.1% позитивних узорака, 2.8% сумњивих и 11307 односно 96.1% негативних. Анализирајући добијене резултате и поредећи их са резултатима које су добили **Velhner и сар., 2005**, **Kles и сар., 1993.** и **McMullin и сар., 1997.**, а на основу навода **EFSA, 2004.b**, да током инфекције живине са салмонелама, имунски систем одговара на инфекцију стварањем антитела на одговарајуће антигене детерминанте или активацијом ћелијског имунског одговора, или на оба начина, и да док је инфекција у развоју, антитела не морају бити присутна, па таква јата могу избећи детекцију уколико се ради само серолошка дијагностика, долазимо до закључка да је период од вакцинације односно вештачке инфекције пилића до узорковања крвних серума пилића 7., 12., 17. и 22. дана живота, сувише кратак за стварање специфичних антитела. Поред овога, добијени резултати можда би се могли објаснити и тврдњом коју наводе **Miljković и Radojičić, 2003.**, мада су за детекцију специфичних антитела кориштена два различита серолошка теста. Перорална вакцинација живом атенуисаном вакцином (произвођач Lohmann Animal Health) не стимулише синтезу довољне количине специфичних антитела IgM, која би се могла установити брзом крвном аглутинацијом (**Miljković и Radojičić, 2003.**).

Разматрајући добијене резултате бактериолошког и серолошког испитивања у циљу коначне дијагнозе салмонелозе, може се закључити да је за коначну дијагностику салмонелозе неопходно обавити бактериолошко испитивање, а посебно у раним фазама инфекције, на шта указују **Saif, 2003.**, **EFSA, 2004.b** и **Skov и сар., 2002.** Коначна дијагноза паратифоидних инфекција зависи од изолације и идентификације узрочника (**Saif, 2003.**). Током инфекције живине са салмонелама, имунски систем одговара на инфекцију стварањем антитела на одговарајуће антигене детерминанте или активацијом ћелијског имунског одговора, или на оба начина (**EFSA, 2004.b**), тако да се серолошке методе користе у комбинацији са бактериолошким методама, јер док је

инфекција у развоју, антитела не морају бити присутна, и таква јата могу избећи детекцију уколико се ради само серолошка дијагностика. У огледу, који је обухватао три групе пилића слободних од салмонела, које су имале по 100 једнодневних пилића, у трајању од 53 недеље, једна огледна група је храњена храном која је садржавала  $10^8$  CFU *Salmonella* Enteritidis, друга огледна група је храњена храном која је садржавала  $10^8$  *Salmonella* Typhimurium а трећа група је била контролна (**Skov и сар., 2002.**). Серолошким испитивањем крвних серума пилића старости 6-7 недеља, утврђено је присуство специфичних антитела у крвним серумима обе огледне групе, код 50% пилића. Током трајања огледа, специфична антитела су била присутна и у крвним серумима и жуманцима јаја обе огледне групе. Резултати испитивања указују да је, поред серолошких дијагностичких метода, у циљу откривања јата живине инфициране салмонелама, неопходна примена бактериолошких метода, посебно у раним фазама инфекције, пре појаве специфичних антитела као одговор организма на антигене узрочника.

Вагањем пилића контролних и огледних група 7. дана живота, није утврђена статистички значајна разлика у телесним масама пилића. Вагањем пилића контролних и огледних група, 14. и 21. дана живота, утврђене су статистички значајне разлике у телесним масама пилића између контролне групе  $K_1$  и контролне групе  $K_2$  као и огледних група, што се може објаснити оптерећењем пилића контролне групе  $K_2$  као и огледних група, са инфективном *Salmonella* Enteritidis. Вагањем пилића 14. и 21. дана живота, утврђене су статистички значајне разлике у телесним масама пилића између контролне групе  $K_2$  и огледних група, што се може објаснити позитивним дејством вакцине на опште стање пилића свих огледних група и позитивним дејством пробиотика и пребиотика на опште стање и телесну масу пилића огледних група  $O_2$  и  $O_3$ , а што је у складу са наводима **BIOMIN Newsletter, 2006.** и **Alltech Inc.**, да Biomin® Poultry5Star и Bio – Mos™ повећавају прираст и искориштавање хране.

## 7. ЗАКЉУЧЦИ

На основу добијених резултата, изводе се следећи закључци:

1. Вештачка перорална инфекција, инокулумом који је садржао  $5 \times 10^4$  CFU/ml *Salmonella* Enteritidis, није изазвала клинички манифестну салмонелозу бројлера вакцинисаних против салмонелозе (TAD SALMONELLA vac E, „LOHMAN A.H.“), а истовремено третираних пребиотиком (Bio – Mos™ Alltech®), односно пробиотиком/пребиотиком (BiominPoultry5 Star).
2. Примена пребиотика Bio – Mos™ Alltech®, довела је до повећања телесне масе бројлера 21. дана огледа.
3. Перорална вакцинација једнодневних бројлера атенуираном вакцином против салмонелозе (TAD SALMONELLA vac E, „LOHMAN A.H.“), није имала утицај на телесну масу бројлера.
4. Пероралном вакцинацијом једнодневних бројлера атенуираном вакцином против салмонелозе (TAD SALMONELLA vac E, „LOHMAN A.H.“), дошло је до редукације фекалног ширења *Salmonella* Enteritidis.
5. У цекумима пилића који су били подвргнути вештачкој инфекцији, 14 дана након инфекције, индиректном методом, нађена је *Salmonella* Enteritidis у истом проценту, у свим групама које су вакцинисане, што значи да ни пробиотик ни пребиотик нису утицали на вакцинална својства *Salmonella* Enteritidis.
6. За дијагностику салмонелозе код живине неопходно је претходно извршити бактериолошка испитивања, због чињенице да је имунски одговор, у раним фазама инфекције, слаб или испод нивоа детекције.

## 8. ЛИТЕРАТУРА

1. **Adachi**, Y., Okazaki, M., Ohno, N., Yadomae, T. 1994. Enhancement of cytokine production by macrophages stimulated with (1-3)-beta-D-glucan, Grifolan (Grn), isolated from *Grifola frondosa*. *Biol. Pharm. Bull* 17, 1554-1560.
2. **Aiba**, Y., Suzuki, N., Kabir, A.M.A. et al. 1998. Lactic acid – mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *Amer. J. Gastroenterol.* 93, 2097-2101.
3. **Alltech Inc.** Nicholasville, KY 40356.
4. **Alltech®.** Lexington, Kentucky.
5. **Amin**, I.I., Douce, G.R., Osborne, M.P., Stephen, J. 1994. Quantitative studies of invasion of rabbit ileal mucosa by *Salmonella typhimurium* strains which differ in virulence in a model of gastroenteritis. *Infect. Immun.* 62, 569-578.
6. **Anonymous.** 1999. Report on the Committee on Drug Use in Food Animals: The use of drugs in food animals, benefits and risks. Washington DC, National Academy Press.
7. **Bailey**, J.S., Blankenship, L.C., Cox, N.A. 1991. Effects of fructooligosaccharide on *Salmonella* colonization of the chicken intestine. *Poultry Science* 70, 2433-2438.
8. **Bailey**, S. 1987. Factors affecting microbial competitive exclusion in poultry. *Food Technol.* 41, 88-92.
9. **Barrow**, P. 1997. Vaccination against *Salmonella* in Poultry. Institute for Animal Health Compton, Nr. Newbury, Berkshire R 6027 NN UK, 1-8.
10. **Barrow**, P.A. 1991. Experimental infection of chickens with *Salmonella enteritidis*. *Avian Pathol.* 20, 145-153.
11. **Barrow**, P.A., Huggins, M.B., Lovell, M.A., Simpson, M.J. 1987. Observation on the pathogenesis of experimental *Salmonella typhimurium* infection in chickens. *Res. Vet. Sci.* 42, 194-199.
12. **Berchieri**, A., De Carvalho, Jr.A.M., Fernandes, S.A., Iba, A.M. 1993. Detection of *Salmonella typhimurium* in a broiler chicken flock. *Rev. Microbiol. São Paulo* 24, 212-213.
13. **Bidin**, Z., 1998. Bolesti peradi. Veterinarski fakultet. Zagreb.
14. **Bilgili**, F. 1995. Competitive exclusion: the basics. *Broiler Industry* 9, 18-25.
15. **BIOMIN Newsletter.** 2005. Vol. 3. No. 30, August.
16. **BIOMIN Newsletter.** 2006. Vol. 4. No. 42, September.
17. **BIOMIN, Newsletter.** 2007. Vol. 5. No. 56.
18. **Blankenship**, C., Cox, A., Bailey, S., Stern, J. 1990. Competitive exclusion cultures in chickens. *Biozyme Service Through Science Technical Symposium*, 37-42.
19. **Bounous**, G., Batist, G., Gold, P. 1991. Whey proteins in cancer prevention. *Cancer Lett.* 57, 91-94.
20. **Bozkurt**, M., Baser, K.H.C. 2003. Anadolu University, Turkey.
21. **Breadly**, L., Savage, T., Timm, K. 1994. The effects of supplementing diet with *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* on male poult performance and ileal morphology. *Poult. Sci.* 73, 1766-1770.
22. **Breytenbach**, J.H., 2004. *Salmonella* Control in poultry. Intervet International b.v.
23. **Brigmon**, R.L., Zam, S.G., Bitton, G., Farrah, S.R. 1992. Detection of *Salmonella enteritidis* in environmental samples by monoclonal antibody based ELISA. *J. Immunol. Methods* 152 (1), 135-142.

24. **Bue, L.**, Chisari G., Abbiati, L., Castiglioni, G., Gismondo, M.R., Nicoletti, G. 1990. Microbiological study of *Enterococcus faecium* SF 68: Postantibiotic effect and growth curves. *Microbiologia* 13, 329-332.
25. **Byrd, J.A.**, Hargis, B.M., Caldwell, D.J., Bailey, L.H., Herron, K.L., McCreynolds, J.L., Brewer, R.L., Anderson, R.C., Bischoff, K.M., Callaway, T.R., Kubena, L.F. 2001. Effect of lactic acid administration in the drinking water during preslaughter feed withdrawal on *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of broilers. *Poultry Science* 80 (3), 278-283.
26. **Carre, B.**, Gomez, J., Chagneau, M. 1995. Contribution of oligosaccharide and polysaccharide digestion, and excreta losses of lactic acid and short chain fatty acids, to dietary metabolisable energy values in broiler chickens and adult cockerels. *Br. Poult. Sci.* 36, 611-629.
27. **Charteris, W.P.**, Kelly, P.M., Morelli, R., Collins, J.K. 1997. The role and therapeutic potential of *Lactobacillus* species in female urogenital tract infections. *Microecol. Therap.* 26, 59-96.
28. **Chesson, A.** 1994. Probiotics and other intestinal mediators. *Principles of Pig Sciences*, Nottingham University Press, UK.
29. **Choi, H.**, Namkung, H., Paik, K. 1994. Effects of dietary fructooligosaccharides on the suppression of intestinal colonization of *Salmonella typhimurium* in broiler chickens. *Korean J. Anim. Sci.* 36, 271-284.
30. **Clifton-Hadley, F.A.**, et all. 2002. A laboratory study of an inactivated bivalent iron restricted *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium dual vaccine against Typhimurium challenge in chickens. *Vet. Microbiology* 89 (2-3), 167-179.
31. **Collington, K.**, Parker, S., Armstrong, G. 1990. The influence of inclusion of either an antibiotic or a probiotic the diet on the development of digestive enzyme activity in the pig. *Br. J. Nutr.* 64, 59-70.
32. **Cooke, B.C.** 2002. The industrial production of safe animal feeds in Europe. *Food Assurance in the Pre-harvest Phase. Wageningen Academic* 2, 71-86.
33. **Coon, N.**, Leske, L., Akavanichan, O., Cheng, K. 1990. Effect of oligosaccharide-free soybean meal on true metabolizable energy and fiber digestion in adult roosters and broilers. *Zootechnica Int.* 9, 44-48.
34. **Davies, R.**, Breslin, M. 2003. Effects of vaccination and other preventive methods for *Salmonella enteritidis* on commercial laying chicken farms. *Vet. Rec.* 29 673-677.
35. **Davies, R.H.**, Breslin, M., Bedford, S., Wray, S. 1998. Observations on *Salmonella* contamination on turkey farms. In: *Proceedings of the 1<sup>th</sup> International Symposium on Turkey Diseases*, Berlin, 19-21 Feb., 274-290.
36. **Davies, R.H.**, Hinton, M.H. 2002. *Salmonella* in animal feed. In: *Salmonella in domestic animals*. Eds. C. Wray, A., Wray, CAB International, Oxford, England, 285-300.
37. **Delzenne, M.**, Roberfroid, B. 1994. Physiological effects of non-digestible oligosaccharides. *Lebensm. Wiss. Technol.* 27, 1-6.
38. **Desmidt, M.**, Ducatelle, R., Haesebrouck, F. 1997. Pathogenesis of *Salmonella enteritidis* phage type four after experimental infection of young chickens. *Veterinary Microbiology* 56, 99-109.
39. **Dewegowda, G.**, Aravind, R., Rajendra, K., Morton, G., Baburanthna, A., Sudarshan, C. 1994. A Biological approach to counteract aflatoxicosis in broiler chickens and ducklings by the use of *Saccharomyces cerevisiae* cultures in the feed. *Biotechnology in the Feed Industry* 5, 235-245.

40. **Durst, L.** 1996. Inclusion of fructo-oligosaccharides in broiler diets. *Archiv fur Geflugelkunde* 60, 160-164.
41. **EFSA (European Food Safety Authority).** 2004.a. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on a request from the Commission related to the use of antimicrobials for the control of the Salmonella in poultry. *The EFSA Journal* 115, 1-83.
42. **EFSA (European Food Safety Authority).** 2004.b. The use of vaccines for the control of Salmonella in poultry. *The EFSA Journal* 114, 1-74.
43. **Engvall, E., Jonsson, K., Perlmann, P.** 1971. Enzyme linked immunosorbent assay. Quantitative assay of preprotein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme labelled antigen and antibody coated tubes. *Biochem. Biophys. Acta* 251 (3), 427-434.
44. **Ewing, N., Cole, A.** 1994. *The Living Gut. An Introduction to Micro-organisms in Nutrition.* Context publication, Leicestershire, United Kingdom.
45. **Fernandes, E., Shahani, M., Amer, A.** 1987. Therapeutic role of dietary lactobacilli and dairy products fermented by lactobacilli. *FEMS Microbiol. Rev.* 46, 343-356.
46. **Ferreira, A.J.P., Ferreira, C.S.A., Knobl, T., Moreno, A.M., Bacarro, M.R., Chen, M., Robach, M., Mead, G.C.** 2003. Comparison of three commercial competitive-exclusion products for controlling Salmonella colonization of broilers in Brasil. *Journal of Food Protection* 66(3), 490-492.
47. **Flory, M., Jones, L., Miller, F., Warren, S.** 1995. Regulatory roles of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1-beta in monocyte chemoattractant protein-1-mediated pulmonary granuloma formation in the rat. *Am. J. Pathol.* 146, 450-462.
48. **Forenbaher, S.** 1983. *Klinička patologija probave i mijene tvari domaćih životinja.* Sv. I/2, JAZU, Zagreb.
49. **Freter, R., Nader de Macias, E.** 1995. Factors affecting the colonization of the gut by Lactobacilli and other bacteria. Old Herborn University, Herborn Dill.
50. **Friend, A., Fermer, E., Shahani, M.** 1982. Effect of feeding and intraperitoneal implantation of yogurt cultures cells on Erlich ascites tumour. *Milchwissenschaft* 37, 708-710.
51. **Fuller, R.** 1989. Probiotics in man and animal. *J. Appl. Bacteriol.* 66, 365-378.
52. **Fuller, R.** 1991. Probiotics in humane medicine. *Gut* 32, 439-442.
53. **Fuller, R.** 1992. *Probiotics 1. The scientific basis.* Chapman&Hall, London.
54. **Gaskins, R.** 1996. Development and structure of mucosal defense in the pig intestine. *Biotechnology in the Feed Industry* 12, 23-35.
55. **Gast, R.K., Beard, C.W.** 1990. Production of Salmonella enteritidis-contaminated eggs by experimentally infected hens. *Avian Dis.* 34, 438-436.
56. **Gast, R.K., Beard, C.W.** 1992. Evaluation of a chick mortality model for predicting the consequences of Salmonella enteritidis infections in laying hens. *Poult. Sci.* 71, 281-287.
57. **Gast, R.K., Stephens, J.F.** 1988. Effects of kanamycin administration to poultry on the proliferation of drug-resistant Salmonella. *Poult. Sci.* 67, 689-698.
58. **Gast, R.K., Stephens, J.F., Foster, D.N.** 1988. Effects of kanamycin administration to poultry on the interspecies transmission of drug-resistant Salmonella. *Poult. Sci.* 67, 699-706.
59. **Gibson, G., Roberfroid, M.** 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125, 1401-1412.
60. **Gibson, R., Wang, X.** 1994. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J. Appl. Bact.* 77, 412-420.

61. **Goodnough**, M.C., Johnson, E.A. 1991. Control of Salmonella enteritidis infection in poultry by polymixin B and trimethoprim. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 785-788.
62. **Gorbach**, L., Barya, M., Giuliano, M., Jacobus, V. 1988. Colonization resistance of the human intestinal microflora: testing the hypothesis in normal volunteers. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 7, 98-102.
63. **Goren**, E., de Jong, A., Doornenbal, P., Bolder, M., Mulder, W., Jansen, A. 1988. Reduction of Salmonella infection on broilers by spray application of intestinal microflora: a longitudinal study. *Vet. Quart.* 10, 249-254.
64. **Gorham**, S.L., Kadavil, K., Vaughan, E., Lambert, H., Abel, J., Pert, B. 1994. Gross and microscopic lesions in young chickens experimentally infected with Salmonella enteritidis. *Avian Dis.* 38, 816-821.
65. **Gutzwiller**, A., Wyss, U. 1988. Der Einfluß von Milchsäurebakterien (Streptococcus faecium M 74) auf die Mastleistung und Gesundheit Von Mastkälbern. *Landwirtschaft Schweiz* 1, 37-40.
66. **Hakkinen**, M., Nurmi, E., Nuotio, L. 1997. Competitive exclusion: present status. XI<sup>th</sup> International Congress of the veterinary poultry Association, Abstracts, 112.
67. **Harris**, C., Pierce, K., King, G., Yates, M., Hall, J., Tizard, J. 1991. Efficacy of acemann in treatment of canine and feline spontaneous neoplasms. *Mol. Biotherm.* 3, 207-213.
68. **Hata**, Y., Yamamoto, M., Ohni, M. et al. 1996. A placebo controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *Amer. J. Clin. Nutr.* 64, 767-771.
69. **Hentges**, J. 1983. Role of the intestinal microflora in host defense against infection. *Human Intestinal Microflora in Health and Disease*, Academic Press, London.
70. **Henzler**, D.J., Opitz, H.M. 1992. The role of mice in the epizootiology of Salmonella enteritidis infection on chicken layer farms. *Avian Dis.* 36, 625-631.
71. **Hinton**, M. 1988. Salmonella infection in chicks following the consumption of artificially contaminated feed. *Epidemiol. Infect.* 100, 247-256.
72. **Hirayama**, K., Rafter, J. 1999. The role of lactic acid bacteria in colon cancer prevention: Mechanistic consideration. *Antonievan Leeuwenhoek* 76, 391-394.
73. **Hosono**, A. 1988. The role of lactic acid bacteria as a scavenger of N-nitroso compounds in the intestinal tract. *Bull. Jpn. Dairy Tec. Assoc.* 38, 1-17.
74. **Impey**, S., Mead, C. 1989. Fate of salmonellas in the alimentary tract of chicks pre-treated with a mature caecal microflora to increase colonization resistance. *J. Appl. Bacteriol.* 66, 469.
75. **Isomaki**, O., Vuento, R., Granfors, K. 1989. Serological diagnosis of salmonella infections by enzyme immunoassay. *Lancet* 1 (8652), 1411-1414.
76. **Ivetić**, V., Valter, D., Pavlović, I., Miljković, B., Maslić – Strizak, D., Ilić, Ž., Savić, B., Stanojević, S., Spalević, Lj., 2003. *ATLAS Bolesti živine*. Naučni institut za veterinarstvo Srbije. Beograd.
77. **Janeway**, A. 1993. *Scientific America*, September, 73-79.
78. **Jansen**, J., Van der Waaij, D. 1995. Prospects of use in opportunistic infections: review of the internal discussion. *Probiotics*. Old Herborn University, Herborn Dill.
79. **Jones**, F.T., Richardson, K.E. 2004. Salmonella in commercially manufactured feeds. *Poultry Science* 83, 384-391.
80. **Jung**, Y.S., Anderson, R.C., Byrd, J.A., Edrington, T.S., Moore, R.W., Callaway, T.R., McCreynolds, J.L., Nisbet, D.J. 2003. Reducing of Salmonella typhimurium



- in experimentally challenged broilers by nitrate adaptation and chlorate supplementation in drinking water. *Journal of Food Protection* 66 (4), 660-663.
81. **Kennedy, T.**, Bates, J., Wheatley, L., Rohrbach, S. 1995. Discrete pathways for arachidonic acid release from tannin versus beta-glucan-stimulated rabbit alveolar macrophages. *J. Leukocyte Biol.* 58, 241-248.
  82. **Kles, V.** et al. 1993. Serologic diagnosis of avian salmonellosis: adjustment of an ELISA test using antigens adsorbed with the aid of anti colibacillary sera. *Zentralbl. Veterinarmed. B.* 40 (5), 305-325.
  83. **Knežević, N.**, Matejić, M., 1996. Bolesti pernate živine. Veterinarski fakultet. Beograd.
  84. **Kobland, J.D.**, Gale, G.O., Gustafson, R.H., Simkins, K.L. 1987. Comparison of therapeutic versus subtherapeutic levels of chlortetracycline in the diet for selection of resistant *Salmonella* in experimentally challenged chickens. *Poult. Sci.* 66, 1129-1137.
  85. **Kopanic, R.J., Jr.**, Sheldon, B.W., Wright, C.G. 1994. Cockroaches as vectors of *Salmonella*: Laboratory and field trials. *J. Food Prot.* 57, 125-137.
  86. **Lee, K.**, Salminen, S. 1995. The coming age of probiotics. *Trends Food Sci. Technol.* 6, 241-245.
  87. **Lehmann, J.**, Bellmann, J., Werner, S., Schröder, R., Schutze, N., Alber, G. 2001. IL-12 p40-dependent agonistic effects on the development of protective innate and adaptive immunity against *Salmonella enteritidis*. *J. Immunol.* 167, 5304-5315.
  88. **Leske, L.**, Jevne, J., Coon, N. 1993. Effect of oligosaccharide additions on nitrogen corrected true metabolizable energy of soy protein concentrate. *Poult. Sci.* 72, 664-668.
  89. **Leung, K.Y.**, Finlay, B.B. 1991. Intracellular replication is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 11470-11474.
  90. **Lyons, T.** 1994. Biotechnology in the feed industry: 1994 and beyond. *Biotechnology in the Feed Industry* 10, 1-48.
  91. **MacDonald, F.** 1995. Use of immunostimulants in agricultural applications. *Biotechnology in the Feed Industry* 11, 97-103.
  92. **MacFarlane, T.**, Cummings, H. 1991. The colonic flora, fermentation and large bowel digestive function. *The large intestine. Physiology, Pathophysiology and Disease.* Raven Press, New York
  93. **Marković, R.**, Šefer, D., Jovanović, N., Sinovec, Z. 1997. Uloga polisaharida u patogenezi oboljenja živine. *Nauka u živinarstvu* 1-2, 55-63.
  94. **Marteau, P.**, Rambaud, J.C. 1993. Potential of using lactic acid bacteria for therapy and immunomodulation in man. *FEMS Microbiol. Rev.* 12, 207-220.
  95. **McAllister, J.C.**, Steelman, C.D., Skeeles, J.K. 1994. Reservoir competence of the lesser mealworm (Coleoptera: Tenebrionidae) for *Salmonella typhimurium* (Eubacteriales: Enterobacteriaceae). *J. Med. Entomol.* 31, 369-372.
  96. **McCracken, B.J.**, Gaskins, H.R. 1999. Probiotics and the immune system. In "Probiotics: A Critical Review", ed. G.W. Tannock, pp. 85-111., Horizon Scientific Press, Norfolk, England.
  97. **McMullin, P.F.**, Gooderham, K.R., Hayes, G. 1997. A commercial *Salmonella enteritidis* ELISA test: results arising for its use in monitoring for infection and response to an inactivated vaccine. *World Veterinary Poultry Association Congress, Budapest.*
  98. **Mead, G.C.** 2000. Review: Prospects for "competitive exclusion" treatment to control salmonellae and other foodborne pathogens in poultry. *Veterinary Journal* 159, 111-123.

99. **Micheti, P.**, Dorta, G. et all. 1999. Effect of wheybased culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* (johnsonii) La1 on *Helicobacter pylori* infection in humans. Digestion. In Press.
100. **Miles, D.**, Bootwalla, M. 1991. Direct feed microbials in animal production. Direct feed microbials in animal production. National Feed Ingredient Association, Iowa.
101. **Miljković, B.**, Radojičić, M. 2003. Imunološki mehanizmi zaštite kod primene oralne vakcine protiv *Salmonella enteritidis*. V Epizootiološki dani. Zbornik radova i kratkih sadržaja, 277-279.
102. **Mizuno, T.**, Kinoshita, T., Zhuang, C., Ito, H., Mayuzumi, Y. 1995. Antitumor-active heteroglykans from *Niohshimeji* mushroom, *Tricholma giganteum*. Biosci. Biotech. 59, 568-571.
103. **Moore, V.A.** 1985. On a pathogenic bacillus of the hog-cholera group associated with a fatal disease in pigeons. USDA BAI Bull 8, 71-76.
104. **Muirhead, S.** 1994. Feed Additive Compendium. Miller Publishing, Minnetonka, MN.
105. **Mul, J.**, Perry, G. 1994. The role oligosaccharides play in animal nutrition. Feed Manufactures Conference, University of Nottingham, Loughborough.
106. **Mulder, W.**, Bolder, M. 1991. Reduction of *Campylobacter* infection in broilers by competitive exclusion treatment by day-old chicks. Colonisation Control of Human Bacterial Enteropathogens in Poultry. Academic Press, London.
107. **Nadathur, R.**, Gould, J., Bakalinsky, T. 1994. Antimutagenicity of fermented milk. J. Dairy Sci. 77, 3287-3295.
108. **Nakamura, M.**, Nagamine, N., Suzuki, S., Norimatsu, M., Oishi, K., Kijima, M., Tamura, Y., Sato, S. 1993. Long-term shedding of *Salmonella enteritidis* in chickens which received a contact exposure within 24 hrs of hatching. Jpn. Vet. Med. Sci. 55, 649-653.
109. **Nakamura, M.**, Nagamine, N., Takahashi, T., Suzuki, S., Sato, S. 1992. Evaluation of efficacy of a bacterin against *Salmonella enteritidis* infection and the effect of stress after vaccination. Avian Diseases 38, 717-724.
110. **Nakamura, Y.**, Masuda, O., Takano, T. 1996. Decrease of tissue angiotensin-I-converting enzyme activity upon feeding sour milk in spontaneously hypertensive rats. Biosci. Biotechnol. Biochem. 60, 488-489.
111. **Nakamura, Y.**, Yamamoto, N., Sakai, K., Takano, T. 1995. Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin-I/converting enzyme. J. Dairy Sci. 78, 1253-1257.
112. **Newman, E.** 1997. Addressing *Salmonella* control with biotechnology. Poult. Digest. 56, 552-557.
113. **Newman, K.** 1994. Mannan-oligosaccharides: Natural polymers with significant impact on the gastrointestinal microflora and the immune system. Biotechnology in the Feed Industry 10, 167-174.
114. **Newman, K.** 1996. Nutritional manipulation of the gastrointestinal tract to eliminate salmonella and other pathogens. Biotechnology in the Feed Industry 12, 37-46.
115. **Newman, K.** 1999. Feeds with antibiotic growth promoters: The oligosaccharide alternative. Alltech's 1999 European, Middle Eastern and African Lecture Tour.
116. **Nicholas, R.A.**, Cullen, G.A. 1991. Development and application of an ELISA for detecting antibodies to *Salmonella enteritidis* in chicken flocks. Vet. Rec. 128 (4), 74-76.
117. **Nouusiainen, J.**, Suoni, K. 1991. Comparative observation on selected probiotics and olaquinox as feed additive for piglets around weaning. 2. Effects of villus

- length and crypt depth in the jejunum, ileum, ceceum and colon. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 66, 224-230.
118. **Ohno**, N., Asada, N., Adachi, Y., Yadomae, T. 1995. Enhancement of LPS triggered TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor) production by (1-3)-beta-D-glucans in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 18, 126-133.
119. **OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**, 2008. 6<sup>th</sup> Edition, Volume 1 and 2, Paris.
120. **Orlić**, D., Vidić, B., Suvajdžić, L., Stojanov, I. 2001. Salmoneloza živine, mere kontrole u cilju obezbeđenja zdravstveno ispravnih jaja i mesa za ishranu. Zbornik rezimea, 1. Međunarodni simpozijum „Hrana u 21. veku“, 14-17. novembar, Subotica, Jugoslavija, Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, str. 254.
121. **Oyofa**, B.A., DeLoach, J.R., Corrier, D.E., Norman, J.O., Ziprin, R.L., Mollenhauer, H.H. 1989.b. Prevention of *Salmonella typhimurium* colonization of broilers with D-mannose. *Poultry Sci.* 68, 1357-1360.
122. **Oyofa**, B.A., DeLoach, J.R., Corrier, D.E., Norman, J.O., Ziprin, R.L., Mollenhauer, H.H. 1989.a. Effect of carbohydrates on *Salmonella typhimurium* colonization in broiler chickens. *Avian Dis.* 33, 531-534.
123. **Oyofa**, B.A., Droleskey, R.E., Norman, J.O., Mollenhauer, H.H., Ziprin, R.L., Corrier, D.E., DeLoach, J.R. 1989.c. Inhibition by mannose of in vitro colonization of chicken small intestine by *Salmonella typhimurium*. *Poultry Sci.* 68, 1351-1356.
124. **Padron**, M.N. 1990. *Salmonella typhimurium* outbreak in broiler chicken flocks in Mexico. *Avian Dis.* 34, 221-223.
125. **Patterson**, J.A., Burkholder, K.M. 2003. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poultry Science* 82 (4), 627-631.
126. **Perić**, L. 2004. Efekat Bio – Mos<sup>TM</sup> – a na proizvodne rezultate brojlerskih pilića. Poljoprivredni fakultet Novi Sad.
127. **Petersen**, M., Steadman, R., Williams, D. 1994. Human neutrophils are selectively activated by independeny ligation of the subunits CD 11B/CD18 integrin. *J. Leukocyte Biol.* 56, 707-713.
128. **Peterson**, S., Mackintosh, B. 1994. The clinical composition and nutritive value of Australian grain legumes. *Grain. Res. Develop. Corp.*, 10-13, 38-41.
129. **Phaff**, J., Kurtzman, P. 1984. *The Yeast*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
130. **Pivnick**, H., Nurmi, E. 1982. The Nurmi concept and its role in control of *Salmonella* in poultry. In: Davies, R. (ed.) *Developments in Food Microbiology – 1 Applied Science Publishers*. Barking, pp 41-70.
131. **Pupavac**, S., Sinovec, Z., Jeremić, D. 1998.a. Rezultati korišćenja manan – oligosaharida u ishrani brojlera. *Nauka u živinarstvu* 1-2, 459-471.
132. **Pupavac**, S., Sinovec, Z., Krnjajić, D., Šefer, D., Jerković, B. 1998.b. Rezultati korišćenja Yeasture<sup>TM</sup> u ishrani odbijene prasadi. VIII Simpozijum tehnologije stočne hrane, 156-163.
133. **Rajić**, I., Avakumović, Đ., Stevanović, Đ. 1996. Stimulatori rasta. II Savetovanje o lekovima za upotrebu u veterini, 67-71.
134. **Resanović**, R., Rašić, Z., Kureljušić, B., Vučićević, I., 2009. Salmoneloza u živinarstvu u svetlu uvođenja vakcinacije. *Veterinarski glasnik* 63 (3-4), 143-266. Beograd.
135. **Rolfe**, D. 1991. Population dynamics of the intestinal tract. *Colonization Control of Human Enteropathogens in Poultry*. Academic Press Inc., San Diego.
136. **Rosen**, D.G. 1996. Feed additive nomenclature. *Poult. Inter.* 35, 46-50.
137. **Saif**, M.J. 2003. *Diseases of Poultry*, 11<sup>th</sup> Edition. Iowa State Press.

138. **Sakurai**, T., Ohno, N., Suzuki, I., Yadomae, T. 1995. Effect of soluble fungal (1-3)-beta-D-glucan obtained from *Sclerotinia sclerotiorum* on alveolar macrophage activation. *Immunopharmacol.* 30, 157-166.
139. **Sanders**, M.A. 1999. Probiotics. *Food Technology*, Vol. 53. No. 11.
140. **Savage**, C. 1987. Factors influencing biocontrol of bacterial pathogens in the intestine. *Food Technol.* 41, 82-87.
141. **Savage**, F., Cotter, F., Zakrzewska, I. 1996. The effect of feeding a mannan oligosaccharide on immunoglobulins, plasma IgG and IgA of Wrolstad MW male turkey. *Poult. Sci.* 75 (suppl. 1), 121-125.
142. **Sawada**, H., Furushiro, M., Hirai, K. et al. 1990. Purification and characterisation of an antihypertensive compound from *Lactobacillus casei*. *Agric. Biol. Chem.* 54, 3211-3119.
143. **Saxelin**, M. 1997. *Lactobacillus GG* - a human probiotic strain with through clinical documentation. *Food Rev. Int.* 13, 293-313.
144. **Schleifer**, J., Juven, B.J., Beard, C.W., Cox, N.A. 1984. The susceptibility of chicks to *Salmonella* Montevideo in artificially contaminated poultry feed. *Avian Dis.* 28, 497-503.
145. **Schneitz**, C., Mead, G. 2002. Competitive exclusion in *Salmonella* in Domestic Animals. In: Wray, C. and Wray A. (eds.) *Salmonella in Domestic Animals*. CABI publishing, New York, pp 301-322.
146. **Schoeni**, L., Wong, L. 1994. Inhibition of *Campylobacter jejuni* colonization in chicks by defined competitive exclusion cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1191-1197.
147. **Sharon**, N., Lis, H. 1993. Carbohydrates in cell recognition. *Scientific American* 1, 5-7.
148. **Shivaprasad**, H.L., Timoney, J.F., Morales, S., Lucio, B., Baker, R.C. 1990. Pathogenesis of *Salmonella enteritidis* infection in laying chickens, I Studies on egg transmission, clinical signs, fecal shedding, and serologic responses. *Avian Dis.* 34, 548-557.
149. **Sinovec**, Z. 2000. Stimulatori rasta u ishrani nepreživara. Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine.
150. **Sinovec**, Z., Marković, R. 2000. Uticaj različitih biostimulatora na proizvodne rezultate i zdravstveno stanje brojlera. Alltech's 2000 European, Middle Eastern and African Lecture Tour, neobjavljeni rezultati
151. **Sinovec**, Z., Marković, R., Jovanović, N., Šefer, D., Nedeljković – Trailović, J. 1998. Značaj gastrointestinalne mikroflore nepreživara. *Savremena poljoprivreda* 48 (1-2), 189-192.
152. **Sinovec**, Z., Marković, R., Krnjajić, D., Prodanov, R. 2000. Alternative biostimulators in broiler nutrition. VII Macedonian poultry days, 44-45.
153. **Sinovec**, Z., Ševković, N. 1996.b. Stimulatori rasta u ishrani. V Savetovanje o primeni premiksa u stočnoj hrani, 46-50.
154. **Sinovec**, Z., Ševković, N. 1996.a. Antibiotici – probiotici – prebiotici. VI Simpozijum tehnologije stočne hrane, 49-54.
155. **Sinovec**, Z., Ševković, N. 1999. Uticaj salinomicina na proizvodne rezultate prasadi. Savetovanje „Primena premiksa i dodatka u stočnoj hrani“. Župa, neobjavljeni rezultati.
156. **Skov**, M.N., Feld, N.C., Carstensen, b., Madsen, M. 2002. The serologic response to *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* in experimentally infected chickens, followed by an indirect lipopolysaccharide enzyme linked

- immunosorbent assay and bacteriologic examinations through a one year period. *Avian Diseases* 46 (2), 265-273.
157. **Spiegel**, J., Rose, R., Karabell., R., Frankos, V., Schmitt, D. 1994. Safety and benefits of fructo-oligosaccharides as food ingredients. *Food Technol.* 15, 151-158.
158. **Spring**, P. 1995. Competitive exclusion of *Salmonella* using bacterial cultures and oligosaccharides. *Biotechnology in the Feed Industry* 11, 383-388.
159. **Spring**, P. 1996. Effects of mannanoligosaccharide on different cecal parameters and on cecal concentrations of enteric pathogens in poultry. PhD thesis, Swiss Federal Institute of Technology Zurich, Zurich.
160. **Spring**, P., Weng, C., Dawson, K.A., Newman, K.E. 2000. The Effects of Dietary Mannanoligosaccharides on Cecal Parameters and the Concentration of Enteric Bacteria in the Ceca of *Salmonella*-Challenged Broiler Chicks. *Poultry Science* 79, 205-211.
161. **Stanley**, G., Sefton, E. 1998. Egg and serum cholesterol as influenced by mannan oligosaccharide and aflatoxin. 14<sup>th</sup> Ann. Symp. *Biotechnology in the Feed Industry*, Ky, 20-22.
162. **Stanley**, G., Woldesenbet, S., Hutchinson, H., Kubena, F. 1993. The use of *Saccharomyces cerevisiae* to suppress the effects of aflatoxicosis in broiler chicks. *Poult. Sci.* 72, 1867-1872.
163. **Stavric**, S., Gleeson, M., Blanchfield, B., Pivnick, H. 1985. Competitive exclusion of *Salmonella* from newly hatched chicks by mixtures of pure bacterial cultures isolated from fecal and cecal contents of adult birds. *J. Food prot.* 48, 778-782.
164. **Suda**, M., Ohno, N., Adachi, Y., Yadoma, T. 1995. Modulation of the antitumor effect and tissue distribution of highly branched (1-3)-beta-D-glucan, Ssg, by carrageenan, *Biol. Pharm. Bull.* 18, 772-775.
165. **Swayne**, D.E., Glisson, J.R., Jackwood, M.W., Reed, M.W. 1998. *A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens*, Fourth Edition. American Association of Avian Pathologists.
166. **Šefer**, D., Sinovec, Z. 1998. Primena biotehnologije u ishrani. Zbornik radova I. VII Kongres veterinarara Jugoslavije, 119-129.
167. **Tannock**, G.W. 1983. Effect of dietary and environmental stress on the gastrointestinal microbiota. In "Human Intestinal Microflora i Health and Disease", ed. D.J. Hentges, pp. 517-539., Academic Press, Inc., London
168. **Tannock**, G.W. 1990. The microecology of lactobacilli inhabiting the gastrointestinal tract. *Adv. Microb. Ecol.* 11, 147-171.
169. **Targan**, R., Shanahan, F. 1994. "Inflammatory Bowel Disease from Bench to Bedside". Williams&Wilkins, Baltimore, Md.
170. **Taylor**, G.R.J., Williams, C.M. 1998. Effects of probiotics and prebiotics on blood lipids. *Brit. J. Nutr.* 80 (Supl. 1), S225-S230.
171. **Trevino**, J., Centeno, C., Brenes, A., Yuste, P., Rubio, L. 1990. Effects of dietary oligosaccharides on the digestion of pea starch by growing chicks. *Anim. Feed Sci. Technol.* 30, 313-319.
172. **U.S. Department of Agriculture**. 1995. Pathogen reduction; hazard analysis and critical control point (HACCP) systems. *Fed. Reg.* 60, 6774-6889.
173. **Van Immersel**, F., Cauweerts, K., Devriese, L.A., Haesebrouck, F., Ducatelle, R.. 2002. Feed additives to control *Salmonella* in poultry. *World's Poult. Sci. J.* 58, 501-513.

174. **Van Zijderveld**, F.G. et al. 1993. Serological detection of chicken flocks with *Salmonella enteritidis*, using an enzyme linked immunosorbent assay based on monoclonal antibodies against the flagellar antigen. *Vet. Q.* 15 (4), 135-137.
175. **Van Zijderveld**, F.G., Van Zijderveld, A.M., Anakotta, J. 1992. Comparison of four different enzyme linked immunosorbent assays for serological diagnosis of *Salmonella enteritidis* infection in experimentally infected chickens. *J. Clin. Microbiol.* 30 (10), 2560-2566.
176. **Vanbelle**, M., Teller, E., Focant, M. 1990. Probiotics in animal nutrition: a review. *Arch. Anim. Nutr.* 40, 543-556.
177. **Velhner**, M., Miljković, B. 2000. Mehanizmi nespecifične odbrane živine u okolnostima infekcije i vakcinacije sa salmonelama. *Živinarstvo* 3-4, 34-36.
178. **Velhner**, M., Stojanov, I., Potkonjak, D., Kapetanov, M., Orlić, D., Rašić, Z. 2005. *Salmonella enteritidis* isolation from broilers chickens infected with low doses. *Acta Veterinaria* 55 (2-3), 183-191.
179. **Verword**, J. 1997. Enteric conditions in ostrich chicks in relation to the use of mannanoligosaccharides. African Lecture Tour Series, Enclosure code 51.013b.
180. **Waldroup**, W., Tidwell, M., Izat, L. 1990. The effects of energy and amino acid levels on performance and carcass quality of male and female broilers grown separately. *Poult. Sci.* 69, 1513-1521.
181. **Wierup**, M., Wahlstrom, H.H., Engstrom., B. 1992. Experience of a 10-year use of competitive exclusion treatment as part of the *Salmonella* control programme in Sweden. *Int. J. Food Microbiol.* 15, 287-91.
182. **Wierup**, M., Wold-Troell, M., Nurmi, E., Hakkinen, M. 1988. Epidemiological evaluation of *Salmonella*—controlling effect of a nationwide use of a competitive exclusion culture in poultry. *Poult. Sci.* 67 (7), 1026-33.
183. **Wray**, C., Wray, A., 2000. *Salmonella* in domestic animals. CABI Publishing, UK.
184. **Yamashita**, K. 1984. Effects of fructooligosaccharides on blood glucose and serum lipids in diabetic subjects. *Nutr. Res.* 4, 961-966.