

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАКУЛТЕТ ВЕТЕРИНАРСКЕ МЕДИЦИНЕ



Никола П. Делић,
дипломирани ветеринар

Испитивање ефикасности фитогених адитива у контроли
дизентерије свиња уз праћење производних резултата
одлучене прасади природно инфициране
бактеријом *Brachyspira hyodysenteriae*

- докторска дисертација -

Београд, 2018

**FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
UNIVERSITY OF BELGRADE**



Nikola P. Delić, DVM

The investigation into the efficacy of phytogenic feed additives in the
control of swine dysentery and the monitoring of production
performance in piglets naturally infected
with *Brachyspira hyodysenteriae*

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

Ментори

Др Јевросима Стевановић, ванредни професор

Факултет ветеринарске медицине

Универзитета у Београду

Др Божидар Савић, ванредни професор

Департман за ветеринарску медицину

Пољопривредни факултет

Универзитет у Новом Саду

Чланови Комисије

Др Зоран Станимировић, редовни професор

Факултет ветеринарске медицине

Универзитета у Београду

Др Бранко Петрујкић, доцент

Факултет ветеринарске медицине

Универзитета у Београду

Др Невенка Алексић, редовни професор

Факултет ветеринарске медицине

Универзитета у Београду

Датум одбране: _____ 2018.

Београд

Докторска дисертација реализована је захваљујући ресурсима научноистраживачког пројекта „Молекуларно-генетичка и еколошка истраживања у заштити аутохтоних анималних генетичких ресурса, очувања добробити, здравља и репродукције гајених животиња и производње безбедне хране” који финансира Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (ев. бр. 46002) и којим руководи проф. др Зоран Станимировић.

**Испитивање ефикасности фитогених адитива у контроли дизентерије свиња уз
праћење производних резултата одлучене прасади природно инфициране бактеријом
*Brachyspira hyodysenteriae***

САЖЕТАК

Дизентерија свиња представља инфективно обољење које доводи до огромних губитака због морталитета прасади, њиховог смањеног прираста, слабе конверзије хране и трошкова лечења. Сузбијање дизентерије свиња антибиотцима често је неефикасно због резистенције узрочника *Brachyspira hyodysenteriae*. Због тога је од изузетног значаја налажење алтернативних начина контроле ове болести. За фитогене адитиве је познато да имају широк спектар корисних дејстава (од којих су најзначајнији антимиembroно, антиинфламаторно и антиоксидативно), без нежељених споредних ефеката који се јављају при примени антибиотика. Међутим, када је реч о могућности коришћења фитогених адитива у превенцији и контроли дизентерије свиња, до сада није спроведено ниједно *in vivo* испитивање, него је само *in vitro* доказана антибактеријска активност неких биљних састојака против *B. hyodysenteriae*. У складу са тим је дефинисан циљ овог рада, а то је процена *in vivo* ефикасности два комерцијална фитогена адитива (Patente Herba® и Patente Herba® Plus) у контроли дизентерије свиња код одлучене прасади природно инфициране бактеријом *B. hyodysenteriae*.

Истраживање је обављено на 64 одлучена прасета старости седам недеља подељених у 4 групе: две су добијале храну у коју је додат адитив Patente Herba®, односно Patente Herba® Plus, трећа је добијала тиамулин (позитивна контрола), а четврта је представљала негативну контролу јер није добијала ни адитив, нити антибиотик. Конзистенција фецеса је бележена сваког дана. Присуство *B. hyodysenteriae* у фецесу испитивано је једном недељно применом микробиолошких метода и PCR теста. Прираст и конверзије хране израчунати су за сваку недељу посебно, као и за цео експериментални период.

B. hyodysenteriae је доказана у свим узорцима применом обе методе, конвенционалне PCR и *real-time* PCR анализе. Резултати *real-time* PCR квантификације показали су да је у свим посматраним периодима највише ДНК бактерије *B. hyodysenteriae*

било у негативној контроли, а најмање у групама третираним препаратом Patente-Herba® Plus 0. и 7. дана, односно групи третираној тиамулином 14. и 21. дана.

Оба испитивана фитогена адитива, Patente-Herba® и Patente-Herba® Plus, испољила су ефикасност у превенцији и контроли избијања дизентерије свиња с обзиром да су утврђене врло значајне разлике ($p < 0,001$) у конзистенцији фецеса између група које су добијале тестиране адитиве и негативне контроле. Између група које су добијале наведене адитиве нису утврђене статистички значајне разлике ($p = 0,334$) у конзистенцији фецеса. Између група које су добијале Patente-Herba® или Patente-Herba® Plus и групе која је добијала тиамулин није било значајних разлика ($p = 0,565$, односно $p = 0,105$) у учесталости нормалног и меког фецеса.

Сви добијени резултати указују да су оба тестирана адитива имала сличну ефикасност, како међусобно, тако и у односу на тиамулин и то не само у –превенцији и контроли избијања дизентерије свиња, него и у утицају на прираст, и унос и конверзију хране. Због тога, али и због негативних ефеката тиамулина, предност у контроли дизентерије свиња треба дати препаратима на бази природних једињења, Patente-Herba® или Patente-Herba® Plus.

Резултати овог рада обезбеђују први доказ ефикасности фитогених адитива у контроли дизентерије свиња. Осим тога, описани протокол за утврђивање ефикасности наведених адитива омогућава будућа испитивања ефеката било којих других фитогених адитива на одлучену прасад природно инфицирану са *Brachyspira hyodysenteriae*.

Кључне речи: *Brachyspira hyodysenteriae*, прасад, дијареја, производни резултати, фитогена једињења

Научна област: Ветеринарска медицина

Ужа научна област: Ветеринарска генетика

УДК број: 619:616.935:636.4

The investigation into the efficacy of phytogenic feed additives in the control of swine dysentery and the monitoring of production performance in piglets naturally infected with *Brachyspira hyodysenteriae*

SUMMARY

Swine dysentery is an infective disease which leads to huge losses due to piglet mortality, their lower weight gain, poor feed conversion and treatment costs. The control of swine dysentery with antibiotics is often ineffective due to the resistance of *Brachyspira hyodysenteriae*. Thus, it is extremely important to develop alternative means of the disease control. Phytogenic additives are known to have a wide spectrum of beneficial activities (those antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidative being the most important), without unwanted side effects similar to those developed by antibiotics. However, no *in vivo* research has been conducted concerning the possibility of the use of phytogenic additives in the prevention and control of swine dysentery, but only the antibacterial activity of some herbal ingredients have been proven *in vitro* against *B. hyodysenteriae*. For these reasons, the goal of this work has been set: the assessment of the *in vivo* efficacy of two commercial phytogenic additives (Patente Herba® and Patente Herba® Plus) in the control of swine dysentery in weaned piglets naturally infected with *B. hyodysenteriae*.

The study involved 64 seven-week old weaned pigs allotted to 4 groups: two were fed on feed supplemented with either Patente Herba® or Patente Herba® Plus, the third received tiamulin (positive control), while the negative control was not given antibiotics or additives. Faecal consistency was recorded daily. The presence of *B. hyodysenteriae* in faeces was investigated weekly using microbiology and PCR test. Weight gain and feed conversion ratio were calculated for each week, and for the whole experiment.

B. hyodysenteriae was detected in all samples by both the conventional PCR and *real-time* PCR techniques. At all time points the results of the *real-time* PCR quantification detected highest quantities of *B. hyodysenteriae* DNA in the negative control, and the least in groups treated with Patente-Herba® Plus on days 0 and 7, and the group treated with tiamuline on days 14 and 21.

Both phytogetic additives, Patente-Herba® and Patente-Herba® Plus, proved effective in the prevention and control of the outbreak of swine dysentery: statistically significant ($p < 0.001$) differences were detected in the faecal consistency between pigs treated with the additives and the negative control. No significant differences ($p = 0.334$) in the faeces quality were detected between the groups treated with the additives tested. Between the groups which received either Patente-Herba® or Patente-Herba® Plus and the piglets administered tiamulin the differences in faeces consistency were insignificant ($p = 0.565$ and $p = 0.105$, respectively).

The obtained results suggested the similar efficacy of the two additives tested, which is not unlike that of tiamulin, not only in the prevention and control of dysentery outbreak, but also in the effects on weight gain, and feed consumption and conversion ratio. For these reasons, plus owing to the negative effects of tiamulin, preparations based on natural compounds - Patente-Herba® or and Patente-Herba® Plus - should be favoured over tiamulin in the control of swine dysentery.

The results of the current work produced the first proof of the efficacy of phytogetic additives in the control of swine dysentery. In addition, the protocol of the assessment of efficacy of the additives tested enables further investigation into the effects of any other phytogetic additive on weaned piglets naturally infected with *Brachyspira hyodysenteriae*.

Keywords: *Brachyspira hyodysenteriae*, piglets, diarrhea, performance, phytogetic compounds

Major field of study: Veterinary Medicine

Special field of study: Veterinary Genetics

UDC number: 619:616.935:636.4

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ	3
3. ЦИЉ И ЗАДАЦИ	33
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	34
5. РЕЗУЛТАТИ	43
6. ДИСКУСИЈА	55
7. ЗАКЉУЧЦИ	68
8. ЛИТЕРАТУРА	70

1. УВОД

Дизентерија свиња је обољење које карактерише муко-хеморагично запаљење слузокоже дебелих црева, са стварањем фибрино-некротичних псеудомембрана. Узрочник овог обољења је бактерија *Brachyspira hyodysenteriae*, анаеробна спирохета која припада фамилији *Brachyspiraceae* из реда *Spirochaetales* у оквиру класе *Spirochaetales*. *B. hyodysenteriae* поседује изразиту хемолитичку активност. Значајан фактор вируленције *B. hyodysenteriae* је њена изражена покретљивост у садржају и мукусу дебелих црева, као и присуство гена за синтезу ензима NADH оксидазе који јој обезбеђује преживљавање у микроаерофилним условима. На настанак болести у великој мери утичу начин исхране, присуство синергистичке флоре и стресогени фактори. Резервар *B. hyodysenteriae* је интестинални тракт свиња, пацова, мишева и дивљих птица. Животиње које преболе клиничко обољење могу излучивати *B. hyodysenteriae* путем фецеса три месеца, па чак и дуже. Инфекција настаје феко-оралним путем, а поред директног контакта, веома важан пут преношења је и индиректна трансмисија узрочника преко контаминираних одеће, обуће, алата, прибора и превозних средстава.

Клиничко обољење се најчешће јавља код прасади након залучења и код свиња из тога. Период инкубације код природне инфекције износи 10-14 дана. Први знак обољења је појава размекшаног фецеса жуто-зеленкасте боје, слабија конзумација хране и краткотрајно повећање телесне температуре. Како болест напредује, фецес постаје воденаст, временом се појављује и знатна количина слузи, а на крају и примесе крви. У дијареијчном фецесу, се могу уочити „крпице“ одлупљеног епитела дебелих црева (фибринозни ексудат). Дијареја настаје као последица малапсорпције. Иначе, *B. hyodysenteriae* се појављују у фецесу 3-4 дана пре почетка дијареје. Животиње које преживе клиничку форму обољења се опораве након неколико недеља, са знатно умањеним производним перформансама. На фармама где дизентерија има

ендемски карактер, ако се не примењују антимиљробни лекови, клиничка форма дизентерије појављује се периодично у интервалима од 3 до 4 недеље.

Постоји неколико лекова који се користе у лечењу дизентерије свиња, а њихова смањена ефикасност постаје све израженија. То су лекови из групе плеуромутилина (тиамулин и валнемулин), макролида (тилозин и тилвалозин) и линкозамида (линкомицин). Бројни докази стечене смањене осетљивости *B. hyodysenteriae* на овај ограничен број антимиљробних лекова потичу из многих земаља. Због тога постоји потреба за алтернативним начинима контроле дизентерије код свиња. Једно од могућих алтернативних решења јесте примена фитогених адитива. Када је реч о узрочнику дизентерије свиња, у научној литератури доступна су само три рада (два из 2016. и једног из 2017. године) у којима је испитиван бактерицидни потенцијал биљних састојака према *B. hyodysenteriae*. Премда су неки биљни екстракти у тим испитивањима показали антимиљробно дејство према *B. hyodysenteriae*, треба нагласити да су ти резултати добијени у *in vitro* условима. Наиме, до отпочињања ове докторске дисертације у научној литератури није било података о клиничком ефекту биљних препарата на *B. hyodysenteriae* (у *in vivo* условима).

Због свега наведеног, за предмет истраживања ове докторске дисертације одабрано је испитивање ефекта фитогених адитива (Patente Herba® и Patente Herba® Plus) у контроли дизентерије свиња уз процену производних резултата код одлучене прасади природно инфициране са *B. hyodysenteriae*. Испитивање обухвата микробиолошку и молекуларно генетичку детекцију и идентификацију узрочника, макроскопску карактеризацију и класификацију фецеса као индикатора клиничког обољења, као и анализе производних резултата прасади. Од резултата се очекује да обезбеде доношење закључака о успешности и безбедности тестираних адитива у контроли дизентерије свиња, као и давање препоруке о начину њихове примене у пракси.

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

Дизентерија свиња

Дизентерија свиња је инфективно обољење које се клинички манифестује слузаво-хеморагичним проливом, редукцијом телесне масе, дехидратацијом и, не ретко, угинућем уколико се не преузме одоговарајуће лечење, због чега представља врло значајан здравствени и економски проблем у узгоју свиња. Болест изазива огромне финансијске губитке због морталитета, смањеног прираста, слабе конверзије хране, трошкова санације и др. (Hampson, 2012). Период тога може бити продужен за 15-25 дана, а укупни производни трошкови се повећавају за 15-20%.

Дизентерију свиња са клиничком сликом слузаво-крвавог пролива први је описао Whiting 1921. године у САД под именом *Dysentaria suum*, међутим етиологија ове цревне афекције је први пут описана тек у раним 70 годинама прошлог века (Glock и Harris, 1972; Taylor и Alexander, 1971). Етиолошки агенс дизентерије свиња је бактерија, првобитно названа *Treponema hyodyesenteriae* (Harris и сар., 1972). Нешто касније *T. hyodyesenteriae* и β хемолитичка *T. innocens* (Kinyon и Harris, 1979) су пребачене у род *Serpula*, а потом у род *Serpulina* (Stanton, 1992). Данас су ове бактерије, заједно са 5 других врста, класификоване у род *Brachyspira* (Ochiai и сар., 1997).

У нашој земљи дизентерију свиња први је описао Sofrenović, 1947, на пољопривредном имању „Чока“, тада под називом *Gastro-enteritis infectiosa suum* (Lončarević и сар., 1997).

Етиологија

- Опште карактеристике интестиналних спирохета

Род *Brachyspira* је једини род у фамилији *Brachyspiraceae* који припада реду *Spirohaetales* заједно са фамилијама *Leptospiraceae* и *Spirohaetaceae*. Ред *Spirohaetatales* припада класи *Spirohaetaes*. Класа *Spirohaetaes* садржи преко 200 врста бактерија од којих је велики број патоген.

Све спирохете имају благо изувијан - спиралан (змијолик) облик и захваљујући периплазматским флагелама (бичевима) све спирохете су покретне. Број периплазматских бичева је различит код различитих врста и креће се од 2 до чак 200, бичеви су смештени између спољашње мембране и протоплазматског цилиндра и омогућавају покретљивост бактерија у густом вискозном материјалу. Неке спирохете су анаеробне попут *B. hyodusestariae* и *Treponema* spp., а неке микроаерофилне попут *Borellia* spp. Врсте унутар рода *Leptospira* су облигатни аероби (Canale-Parola, 1984).

Карактеристике *Brachyspira* spp.

Биолошка ниша свих до сада познатих врста из рода *Brachyspira* су дебела црева сисара и птица. Спирохете се налазе у непосредној близини епитела слизокоже црева. Иако анаеробне, врсте рода *Brachyspirae* могу метаболирати мање количине кисеоника захваљујући ензиму NADH-оксидаза, што је важна особина ових бактерија, јер им омогућава преживљавање у лумену дебелих црева као и на самој површини слузокоже дебелих црева у којој постоји стална дифузија кисеоника из субинтестиналног ткива (Stanton и сар., 1997). Ћелије *Brachyspira* такође имају благо изувијан - змијолик изглед, њихова дужина се креће од 2,0 μm до 14,0 μm , а промер од 0,19 μm до 0,40 μm . Крајеви ћелије су заобљени, број периплазматских флагела је различит код различитих *Brachyspira* врста и креће се од 2 до 14, а њихов број се удвостручава преклапањем бичева на средини бактеријске ћелије (Sellwood и Bland, 1997).

Неке врсте *Brachyspira* су патогене, друге представљају коменсале, док је патогени потенцијал неколико врста још увек под знаком питања. Седам врста *Brachyspira* је до данас описано, а две скоро детектоване врсте још увек чекају детаљну идентификацију и карактеризацију.

Шест врста *Brachyspira* се могу наћи у дебелом цреву свиња. Две врсте су патогене, *B. hyodysenteriae*, узрочник дизентерије свиња и *B. pilosocoli*, узрочник спирохеталног колитиса свиња. *B. suanatina*, неки сојеви *B. murdochii* и *B. intermedia* спорадично могу бити узрочници колитиса, док се *B. innocens* сматра апатогеном врстом.

Врсте *Brachyspira* које могу да колонизују слузокожу дебелих црева свиња су дуге од 5–11 μm , промера 0.2-0.4 μm . Попут других спирохета, имају два сета периплазматских флагела смештених на супортним половима. Сваки сет флагела је обавијен дуж тела бактерије, а налази се испод спољашњег бактеријског омотача чији се слободни крајеви преклапају на половини ћелије. Флагеле имају способност спиралног мотилитета што омогућава покретљивост бактерија и њихову пенетрацију кроз густ вискозни садржај мукуса на површини епитела дебелих црева (Hampson, 2012).

ДНК *Brachyspira* врста има низак однос гуанина и цитозина који се креће у распону од 24.6-28%. Величина комплетног генома је различита код појединих врста и креће се у распону од 2.5-3.2 милиона нуклеотидних парова, а свака врста има > 2300 кодирајућих секвенци. 16s рРНК већине врста је веома слична што нам говори да је до раздвајања врста унутар рода дошло релативно недавно. Нуклеотидне секвенце комплетног генома *B. hyodysenteriae* соја WA1, *B. pilosocoli* соја 95/1000 и *B. murdochii* сој 56-150Т су депоноване у NCBI банци гена (Bellgard и сар., 2009; Pati и сар., 2010; Wanchanthuek и сар., 2010). *B. hyodysenteriae* садржи про-фаг, односно тзв. генетски преносив агенс (*gene transfer agent* - GTA) величине 7.5 kb који се налазе разбацани у геному, а који се могу преносити у друге *B. hyodysenteriae* сојеве (Humphrey и сар., 1997; Matson и сар., 2005). GTA елементи знатно доприносе реаранжирању гена како унутар једне тако и између различитих *Brachyspira* врста (Zuehner и сар., 2004).

Све врсте бактерија из рода *Brachyspira* су анаеробне, мада могу толеристаи кратку изложеност кисеонику. Такође све врсте на хранљивим подлогама расту веома споро и врло често их прераста друга анаеробна ентерална бактеријска флора уколико се не користе селективне подлоге са

додатком одоговрајућих антибиотика. Карактеристичан раст на хранљивим подлогама свих врста бактерија из рода *Brachyspira* у року од 3-5 дана је у виду дифузног танког филма без формирања колонија на температури од 37-42°C. Растом на подлогама са додатком 5% овчије или говеђе крви настаје интензивна зона β хемолизе карактеристична за *B. hyodysenteriae*, односно слабија зона хемолизе карактеристична за *B. suanatinu* и врло слаба хемолиза (α хемолиза) карактеристична за све друге врсте (Hampson, 2012).

Метаболичка активност *B. hyodysenteriae* и других интестинаних *Brachyspira* је описана од стране Stanton и сар. (2006). Метаболичке карактеристике три комплетно секвенциране врсте су у потпуности одређене при чему је установљено да само мале разлике раздвајају врсте (Bellgard и сар., 2009; Wanchanthuek и сар., 2010). Особине које могу послужити за диференцијацију врста укључују величину и интензитет зоне хемолизе, способност продукције индола и ензимски профил садржан у комерцијалним API-ZYM китовима (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France; Fellström и сар., 1997). Неке компаративне вредности појединих врста *Brachyspira* су приказане у табели. Међутим, ни један метаболички профил се не може користити за идентификацију врста, обизом на појаву сојева са необичним фенотипом код различитих сојева (Thomson и сар., 2001).

Анализом популације *B. hyodysenteriae* применом MLEE доказан је значајан генетски диверзитет ове бактерије која обухвата велики број генетски различитих сојева (Lee и сар., 1993). Такође, утврђено је да врста обухвата врло рекомбинантну популацију сојева *B. hyodysenteriae*, али да ипак има клонални епидемијски потенцијал (Trott и сар., 1997b). Такође, новија истраживања применом MLST (La и сар., 2009b; Råsbäck и сар., 2007, Savić и сар., 2017) и MLVA (Hidalgo и сар., 2010a) су установила значајан генетски диверзитет врсте, међутим на основу установљеног индекса генетских разлика популације (*index of association*) је утврђено да је *B. hyodysenteriae* ипак не-рекомбинантна односно клонална врста. Изолати *B. hyodysenteriae* се могу сврстати у серогрупе на основу антигених карактеристика липоолигосахарида (LOS) ћелијске мембране (Hampson и сар., 1997). Анализом изолата *B. hyodysenteriae* применом молекуларних метода је установљено да нове варијатне односно сојеви *B. hyodysenteriae* могу спонтано настати на фарми (Atyeo и сар., 1999; Hidalgo и сар., 2010b), при чему GTA елементи из других *Brachyspira* врста

имају знатно већу улогу у овој микроеволуцији у односу на мутације настале као као резултат рекомбинација. Новонастали сојеви могу имати потпуно другачије фенотипске карактеристике, факторе вируленције, потенцијал за колонизацију слузокоже црева или осетљивост на антимикуробне лекове. Тако је забележен дрефт у антигеном протеину мембране (LOS) код изолата са исте фарме током дугогодишњег посматрања (Combs и сар., 1992).

Brachyspira hyodysenteriae је дугачка од 6–8.5 μm , промера 0.32–0.38 μm и има 7-14 периплазматских флагела на крајевима бактерије. Бактеријска ћелија је прекривена растреситом спољашњом мембраном. *B. hyodysenteriae* сој WA1 има циркуларни хромозом који садржи ~3.0 мегабазних парова (mbp) и ~36 килобазних парова (kbp) у циркуларном плазмиду (Bellgard и сар., 2009). Многи функционални протеини одговорни за транспорт и метаболизам ових бактерија имају већу сличност са функционалним протеинима *Escherichia coli* и *Clostridium* врста пре него са другим спирохетама што указује на то да су гени који кодирају њихову синтезу временом преузети од других врста бактерија пореклом из цревне флоре највероватније механизмом хоризонталног трансфера гена (Hampson, 2012). Данас је већина функционалних протеина описана према молекулској маси протеина (Hampson и сар., 2006). Тако на пример, липопротеин чија је молекулска маса 29.7 kDa је раније описиван као VmpV или VlpA протеин, а сада означен као Vhlp29.7. Секвенце гена који кодирају синтезу Vhlp29.7 протеина су део локуса четири паралогна тандема гена одговорних за синтезу комплетног липопротеина чија молекулска маса износи око 30 kDa (Cullen и сар., 2003). Такође, варијабилни површински протеин чија молекулска маса износи 39 kDa за који се предпоставља да је важан за избегавање ефекторских механизма имунолошког система је кодиран тзв. повезаним генским копијама, а чија варијабилност је условљена тзв. диференцијацијом генске експресије (McCaman и сар., 2003; Witchell и сар., 2006). Спољашња мембрана *B. hyodysenteriae* садржи липоолигосахарид (LOS) који представља форму липополисахарида (Halter и Joens, 1988). Ген *rfbBADC* који кодира синтезу ензима неопходног за биосинтезу рамнозе је лоциран у плазмиду, за исти ензим се предпоставља да је важан и за асимилацију O-antigena и LOS (Bellgard и сар., 2009). Липоолигосахарид (LOS) *B. hyodysenteriae* има иста биолошка својства као LPS из других грам-негативних бактерија, чији токсични ефекти делују локално на начин да доведе до

нарушавања интегритета епителијалне баријере колона (Nuessen и сар., 1983; Greer и Wannemuehler, 1989; Nibbelink и сар., 1997).

Brachyspira hyodysenteriae поседује бројне гене одговорне за покретљивост (мотилитет) бактерије и хемотаксу (Bellgard и сар., 2009). показујући хемотаксичну и вискотаксичну активност према муцину (Milner и Sellwood 1994; Naresh и Hampson 2010). Ова активност омогућава адхезију *B. hyodysenteriae* на слузокожу дебелих црева (Kennedy и сар., 1988). Инактивација или оштећење флагеларних гена (*flaA* и *flaB*) резултује смањеном покретљивошћу бактерије и способности колонизације слузокоже (Kennedy и сар., 1997; Rosey и сар., 1996).

B. hyodysenteriae поседује изразиту хемолитичку активност (Bellgard и сар., 2009). Значајан фактор вируленције *B. hyodysenteriae* је њена изражена покретљивост у садржају и мукусу дебелих црева (Kennedy и сар., 1997), као и присуство гена за синтезу ензима NADH оксидазе који јој обезбеђује преживљавање у микроаерофилним условима (Stanton и сар., 1999)

Активност ензима NADH оксидазе *B. hyodysenteriae* може олакшати колонизацију цревне слузокоже штитећи је од токсичне активности кисеоника. У вези са тим сојеви *B. hyodysenteriae* са инактивираним NADH оксидаза (*nox*) геном показују далеко мању способност колонизације слузокоже дебелих црева и изазивања болести (Stanton и сар., 1999).

Хемолитичка активност је најважнији фактор вируленције *B. hyodysenteriae*. Три гена (*tlyA*, *tlyB* и *tlyC*) који кодирају синтезу различитих хемолизина *B. hyodysenteriae* су до сада описана, а која показују тип активности карактеристичан за хемолитичке сојеве *E. coli* (ter Huurne и сар., 1994). Такође код *B. hyodysenteriae* је установљен и ген (*hlyA*) који кодира синтезу 8.93 KDa ацил протеин носача са хемолитичком активношћу (Hsu и сар., 2001). Инактивацијом *tly* гена који кодирају синтезу хемолизина значајно се редукује хемолитичку активност и вируленција *B. hyodysenteriae* (Hyatt и сар., 1994). Такође, описана је хемолитичка активност код авирулентних сојева *B. hyodysenteriae* који упућују на то да вероватно постоје и други фактори вируленције (Thomson и сар., 2001).

Brachyspira hyodysenteriae расте у анаеробном окружењу на температуре од 37–42°C на триптоза соја (TS) агару или сличном агару који садржи 5-10% дефибринисане крви. Након 3-5 дана инкубације на хранљивим подлогама

уочава се низак, раван магловит раст бактерија са интензивном зоном бета-хемолизе без формирања колонија, а чије је раст олакшан парањем агара приликом засејавања. Концентрација бактерија од 10^8 до 10^9 у милилитру се достиже након 2-3 дана анаеробне инкубације у TS течним подлогама или *brain heart infusion* (ВНА) подлогама са додатком 10 (в/в) телећег серума. Додавање 1% O_2 у атмосферу знатно олакшава раст *B. hyodysenteriae* (Hampson, 2012).

Епидемиологија

Дизентерија свиња је ендемски присутна скоро у свим земљама са развијеном индустријском производњом свиња. Инциденца обољења варира од земље до земље и региона и свакако се временом мења. У нашој земљи је ова инфекција такође присутна у ендемској форми или се појављује спорадично и времена на време на свим фармама.

Природна инфекција са *B. hyodysenteriae* се дешава искључиво код свиња (укључујући и дивље свиње), а спорадично и неке врсте птица могу бити инфициране (кокоши, патке, гуске и птице тркачице). *B. hyodysenteriae* је изолована из фецеса и дебелих црева мишева, пацова, паса и многих врста дивљих птица. На ендемски инфицираним фармама ширење инфекције се углавном дешава ингестијом контаминираног фецеса што је нарочито значајно на фармама са континуираним и заокруженим циклусом производње („од прасета до товљеника“) и фармама са лошим биосигурносним мерама. Инфекција се у запату шири контаминираним фецесом, запрљаном обучом и одећом радника, запрљаним алатом и прибором. Ширење узрочника је могуће уколико постоји било каква отворена комуникација између боксева за смештај животиња. Контаминирани лагуне представљају значајан извор инфекције због чега их након санирања или затварања не треба поново користити (Glock и сар., 1975). Присуство дивљих и било којих других животиња на фарми представљају потенцијални извор и резервоар инфекције (Hampson, 2012).

Избијање болести на фарми или појављивање нових случајева болести се углавном подудара са увођењем у запат инапаратно инфицираних свиња код којих није спроведена мера карантина и/или профилактички третман са антибиотским лековима. Избијање болести на фарми је забележено и у

случајевима уласка на фарму контаминираних камиона или коришћењем контаминиране хране, али и након уласка на фарму лица која су претходно имала контакт са инфицираним свињама. Повећана инциденца појаве дизентерије свиња забележена је на фармама које нису имале контролисан улазак људи на фарму и на фармама на којима постоји присутна популација глодара. Са друге стране, обезбеђивање одговарајуће одеће и обуће за посетиоце, присуство сигурносних ограда и/или баријера, коришћење хигијенски исправне гране и набавка животиња из запата на којима није забележена инфекција спречавају уношење и појављивање болести на фарми (Hampson, 2012).

Brachyspira hyodysenteriae се излучује преко фецеса у различитим периодима трајања болести и различито дуго. Инфекција настаје феко-оралним путем, а поред директног контакта, веома важан пут преношења је и индиректна трансмисија узрочника преко контаминиране одеће, обуће, алата, прибора и превозних средстава (Hampson и сар., 2012; Markey и сар., 2013). Пријемчивим животињама инфекција се може пренети ако се оне доведу у контакт са инфицираним свињама које не показују клиничке знаке обољења у периоду од 70 дана (Songer и Harris, 1978). *B. hyodysenteriae* је релативно отпорна у спољашњој средини у влажном фецесу. У течној фракцији фецеса *B. hyodysenteriae* може преживети 48 дана на температури од 0–10°C, 7 дана на температури од 25°C и мање од 24h на температури од 37°C (Chia и Taylor 1978). На температури од 10°C у земљишту *B. hyodysenteriae* може преживети 10 дана, 78 дана у земљишту контаминираним фецесом и 112 дана у фецесу (Boye и сар., 2001). Исушивањем дизентеричног фецеса на ваздуху веома брзо се елиминише *B. hyodysenteriae* (Chia и Taylor, 1978), а фенолна једињења као и натријум-хипохлорид су најефикаснији дезинфицијенси против *B. hyodysenteriae* (Hampson, 2012).

Патогенеза

Инфекција настаје ингестијом контаминираног фецеса са *Brachyspira hyodysenteriae*. *B. hyodysenteriae* преживљава киселу средину желуца и пасажом кроз танка црева доспева у дебела црева. У експерименталним инфекцијама

инфективна доза од 10^5 /ml бактеријских јединица (*coli form units* - CFU) може узроковати клиничку форму обољења (Kinyon и сар., 1977), иако је у природним условима инфективна доза знатно већа и износи око 10^{10} CFU. Пролиферација *B. hyodysenteriae* у лумену дебелих црева и колонизација слузокоже дебелих црева могућа је због посебних карактеристика које ова бактерија има, а то су способност коришћења доступног супстрата из лумена дебелих црева за раст и развој, хемотаксична пенетрација бактерија кроз вискозни мукус на површини слузокоже дебелих црева у цревне крипте и отпорност на токсичну активност кисеоника на површини слузокоже колона. Клиничка слика и карактеристичне лезије на слузокожи дебелих црева настају када број бактерија на слузокожи колона достигне 10^6 /cm² (Hughes и сар., 1977; Whipр и сар. 1979). *B. hyodysenteriae* се појављују у фецесу 1–4 дана пре појаве клинички манифестне дијареје (Kinyon и сар., 1977), а што истовремено корелира и са променом у саставу бактеријске флоре у дебелим цревима са преминацијом углавном грам-негативних врста у односу на грам-позитивну бактеријску флору (Robinson и сар., 1984).

Присуство спирохета у непосредној близини епителних ћелија лумена крипти цекума и колона стимулише интензивну продукцију мукуса (Wilcock и Olander, 1979a,b). *B. hyodysenteriae* адхерира на епителне ћелије цревних крипти (Либеркинијеве крипте) мада значај саме адхезије није у потпуности јасан обзиром да је експериментално доказано да адхезија спирохета на ћелијске линије не доводи до оштећења ћелија нити до пенетрације (инвазију) бактерија у ћелије (Bowden и сар., 1989; Кноор и сар., 1979). Такође, ни потпун механизам који доводи до оштећења епителних ћелија мукозе није у потпуности јасан. Хемолизини и LOS *B. hyodysenteriae* имају значајну улогу у локалној деструкцији ткива тако што пре свега доводе до разарања епитела колона. Хемолизини испољавају цитотоксичне ефекте где оштећење ћелијских органела наступа за 0,5-1 час, а ћелијска десквamacија за 3 часа (Zimmerman и сар., 2012). Липоолигосахарид (LOS) има ендотоксичну активност и испољава директан ефекат на епителне ћелије дебелих црева, а може да изазове и инфламаторне процесе путем стимулације IL-1 и фактора некрозе тумора (*tumor necrosis factor* - TNF). Међутим LOS *Brachyspira* је мање потентан него ендотоксин *E. coli* у стимулацији IL-1 и TNF-а (Zimmerman и сар., 2012). Инвадиране епителне ћелије ексфолирају, што постепено доводи до

одлупљивања већих сегмената епитела. На тим местима развија се опсежни едем, инфламаторни процес и екстравазација из прснутих крвних судова. Крвни судови мукозе и субмукозе су тромбозовани, а последична инвазија субмукозе секундарном цревном бактеријском флором и протозоом *Balantidium coli* доприноси настанку лезија. У старијим патолошким алтерацијама јавља се леукоцитна емиграција и фагоцитоза *Brachyspira* и осталих бактерија од стране неутрофилних гранулоцита (Hampson, 2012).

Дијареја и губитак течности настаје као резултат малапсорпције услед оштећеног механизма активног транспорта јона натријума и хлорида из лумена црева односно немогућности колона да врши ресорпцију. Шта више, нивои cAMP и cGMP у мукози колона су нормални, а ентеротоксини и простагландини ослобођени из инфламиране мукозе не учествују у настанку дијареје, тако да се патогенеза дијареје код дизентерије разликује од дијареје коју изазивају ентеропатогени сојеви *E. coli*. Дакле, немогућност ресорпције у колону је довољна да објасни прогресивну дихидратацију и угинуће животиње (Argenzio и сар., 1980, Argenzio, 1981; Schmall и сар., 1983). У прилог овоме говори истраживање Whipp и сар. (1978) који нису успели да изазову накупљање течности у изолованом колону свиња третираног са стерилним филтратом течне културе *B. hyodysenteriae*, као ни да узрокују структурне промене у култури ћелија надбубрежне жлезде (Y-1). Такође, применом инкативисане културе *B. hyodysenteriae* није продуковано карактеристично оштећење на слузокожи нити накупљање течности у колону. Због тога изненадна угинућа која се могу јавити у актуним случајевима болести највероватније настају као последица обимне ресорпције токсина и последичног настанка ендотоксичног шока (Hampson, 2012).

Исхрана има велики значај на настанак дизентерије, али и интестинална флора и стресогени фактори (Jacobson и сар., 2004; Jonasson и сар., 2004). Интересатно је да колонизација слузокоже колона од стране *B. hyodysenteriae* може бити инхибирана исхраном са високосварљивим хранивима (Pluske и сар., 1996), као и са храном богатом инулином (Hansen и сар., 2010; Thomsen и сар., 2007). Ови механизми заштите заснивају се на промени састава цревне флоре и увећању броја врста других бактерија које на различите начине инхибирају раст и размножавање спирохета (Klose и сар., 2010; Leser и сар., 2000; Mølbak и сар., 2007). Са друге стране, нарушавање односа у саставу

бактеријске цревне флоре у правцу повећања броја анаеробних врста олакшава колонизацију слузокоже колона и доприноси интензитету самих лезија (Joens и сар., 1981; Whipр и сар., 1979).

Клиничка слика

Дизентерија се најчешће јавља код одлучене прасади и назимади у предтову. Могу да оболе и старије животиње. Прасад на сиси исто може да оболи, симптоми ове афекције и идентификација каузалног агенса су доказани код прасади старе 10 дана (Lončarević и сар., 1997). Инциденца обољења је најчешћа код прасади у одгајивалишту, а појављује се неколико недеља након пребацивања прасади из прасилишта. То се доводи у везу са променама у начину исхране и држању прасади у одгајивалишту као и преласком на исхрану прасади комплетно сувим оброком. Учесталија инциденца обољења је такође забележена код прасади пореклом од назимица и од крмача које никада нису биле инфициране са *B. hyodysenteriae* (Zimmerman и сар., 2012).

Први знак обољења је појава меког жућкасто-зеленкастог фецеса. У почетку болести запажа се блажа инапетенца, а спорадично (код појединих животиња) и повећање ректалне температуре (40–40,5°C), мада повећање телесне температуре није значајно нити карактеристично за ову болест. Неколико сати до један дан након инфекције у фецесу се уочава знатна количина слузи, често помешана са мањим флокулама крви. Овакво стање брзо прогредира у слузаво-воденасту дијареју са примесама крви и присуством беличастих крпица мукофибринозног ексудата. Често, од самог почетка болести појави се слузаво-крвави пролив. Касније фецес постаје тамно-црвен, браон-црвен и мркоцрне боје у коме се такође примећују мембране крпичастиг изгледа. Животиње постају длакавије, длака губи природан сјај, а слабине им улегну као последица дехидратације. Афектиране животиње се немирне, перинеална регија и дистални делови задњих екстремитета су запрљани браон црвеним, па чак и мркоцрвеним дијарејичним фецесом (Zimmerman и сар., 2012).

По подној површини бокса могу се приметити трагови слузаво крвавог пролива. У појединим случајевима слабији прираст је једина промена која се

може приметити. Познати су и случајеви изненадних угинућа која се чешће срећу у запатима који су први пут атакирани дизентеријом, а угинућа често настају без претходне појаве крвавог пролива. Последица су највероватније велике продукције и брзе ресорпције токсина узрочника који условљава парализу циркулаторног система (Zimmerman и сар., 2012). Већина животиња се опорави након неколико недеља, али са знатно редукованом телесном масом и смањеним прирастом који је присутан до краја производног циклуса.

Инкубациони период је варијабилан и може трајати од 2 дана до чак 3 месеца, али у природним условима болест углавном настаје након 10-14 дана након инфекције. Болест се на фарми постепено шири захватајући новопрстигле животиње. Ток болести је варијабилан како код појединачних животиња тако и унутар групе или комплетног запата. Ипак у највећем броју случајева код инфицираних животиња се јавља перакутни ток болести, а животиње угињавају у року од свега неколико сати (Hampson, 2012).

Код залучене прасади морбидитет може износити до 90%, а морталитет чак до 30% уколико се не предузме одговарајућа терапија. У експерименталним инфекцијама код не терапраних свиња морталитет може достићи чак 50% (Hampson, 2012).

У хронично инфицираним запатима, уколико се спроводи превентивни медикаментозни третман, клиничка форма обољења може бити потпуно одсутна. У експерименталним инфекцијама је показано да на појаву и тежину клиничке форме болести значајно утичу: изложеност стресу, инфективна доза, фаза раста бактерија у инфективном инокулуму (активна фаза пораста бактерија), начин исхране, састав комплетне крмне смеше за исхрану свиња, величина групе и телесна маса животиња (Jacobson и сар., 2004).

У ендемски инфицираним фармама болест се појављује циклично у интервалима од 3 до 4 недеље код појединачних животиња али и у комплетној групи. Учесталије појављивање болести је забележено након престанка примене антибиотских лекова. Појава слузаво хеморагичне дијареје се такође може запазити након пребацивања животиња у друге објекте и при интензивној манипулацији животињама, мешању различитих старосних категорија свиња, при промени начина исхране као и промени састава крмних смеша. Стрес узрокован прекапацитирањем, али и изложеност наглим променама температуре амбијента, такође доприносе учесталијој појави болести. У

случајевима када се примењује антибиотска медицина и у било којим случајевима губитка и/или смањења апетита када животиња не узима храну или пије воду са леком долази до појаве болести.

Патолошко анатомски налаз

Најкарактеристичније лезије у акутном току дизентерије заступљене су на дебелом цревима. Већ при отварању абдоминалне шупљине својом црвено до плавичасто љубичастом бојом истичу се дебела црева (слика 1).

Мезентеријални лимфни чворови су отечени и хиперемични, а у капсули је присутна и мања количина бистре (асцитне) тешности. Кроз серозу дебелих црева просијавају уздигнути беличасти чворићи настали субмукозном агрегацијом моноклеарних ћелијских елемената (слика 2).

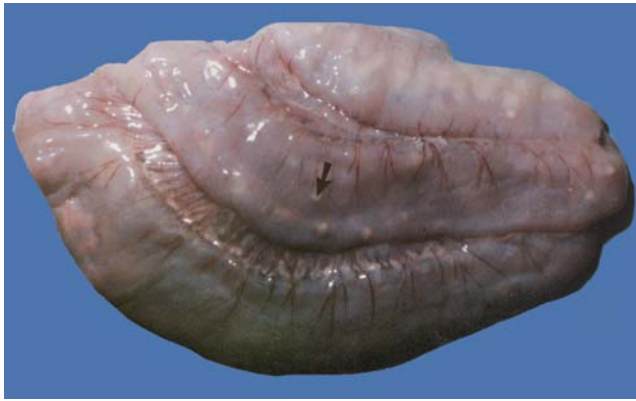
У најблажим случајевима присутан је едем зида колона, а слузокожа је дифузно или дисконтинуирано хиперемична, наборана и прекривена слузавом масом уз примесе крви, па је цревни садржај црвене боје или изнијансиран рђастим тоновима (слика 3).

У узнапредовалим случајевима на едематозној и ретикулираној слузокожи ових сегмената црева уочавају се некротичне дисконтинуиране насlage у форми слабо фиксираних мембрана, а помешане са слузаво хеморагичним ексудатом дају цревном садржају посебан изглед познат под називом „пиринчана чорба“ (слика 4).

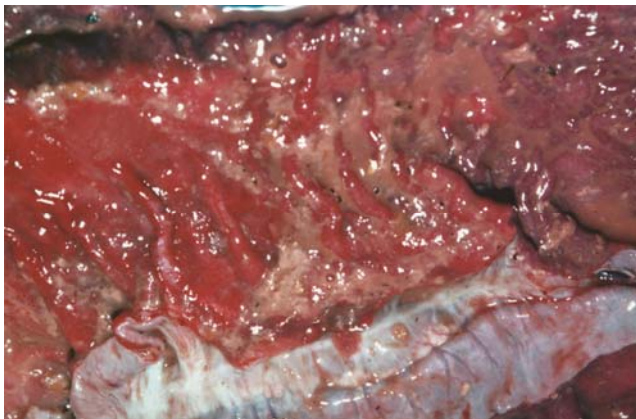
Код дужег тока болести едем зида колона се смањује, а промене на површини слузокоже су израженије и огледају се у појачаној ексудацији фибрина који по површини слузнице формира танак филм у виду мукофибринозних псеудомембрана (слика 5). У хроничним случајевима површина слузокоже је дифузно прекривена танким фибринозним ексудатом који својим изгледом подсећа на суперфицијалну некрозу (слика 6). Лезије могу бити присутне и код клинички здравих свиња у виду дискретних зацрвљених ареала на слузокожи дебелих црева прекривених са слузи, али са нормалним садржајем у лумену црева. Плетора јетре хиперемична и конгестијна



Слика 1. Нупераемиа месосолионис - Дисентериа суум (оригинал)



Слика 2. Сoлитис фолликуларис - Дисентериа суум (оригинал)



Слика 3. Сoлитис псеудомембранасеа - Дисентериа суум (оригинал)



Слика 4. Colitis pseudomembranacea partim haemorrhagica - Dysenteria suum
(оригинал)



Слика 5. Typhlocolitiis pseudomembranacea gradus gravis - Dysenteria suum
(оригинал)



Слика 6. Typhlocolitiis pseudomembranacea gradus gravis - Dysenteria suum
(оригинал)

фундуса желуца се такође може запазити, међутим ове промене нису карактеристичне за дизентерију свиња.

Најзначајније микроскопске промене су у ткиву цекума, колона и ректума. Типичне акутне лезије укључују: васкуларну конгестију са обилнијом екстравазацијом течности и леукоцита и задебљање мукозе субмукозе. Донекле је карактеристичан налаз хиперплазије пехарастних ћелија. Епителне ћелије у базама цревних крипти могу бити издужене и хиперхроматичне. Спирохете се могу уочити у пехарастим ћелијама цревних крипти, али се уочава и њихова пенетрација у тзв. интерцелуларним џеповима епитела. Ипак, узрочници су најбројнији у лумену крипти у акутној фази болести. На неким местима запажа се губитак кохезије ентероцита колона, некроза и потпуно одсуство епитела. У ламини проприи (*lamina propria*) повећан је број леукоцита са фокалном акумулацијом неутрофила у и око капилара. Понекад се и у ламини проприи (*lamina propria*) могу уочити спирохете нарочито око крвних судова. Крварења настају из деструраних крвних судова испод еродираног епитела. На местима ерозије епитела уочава се инвазија бактеријске флоре колона. Нешто касније, у цревним криптама и на површини слузокоже, запажа се екстензивна акумулација фибрина, мукуса и целуларног инфилтрата. Суперфицијална некроза може бити екстензивна, мада дубље улцерозне алтерације нису карактеристичне. У хроничним случајевима екстензивна суперфицијална некроза слузокоже прекривена дебљим фибринозним псеудомембранама је назначаванији микроскопски налаз.

Ултраструктурне промене у почетку инфекције се карактеришу присуством великог броја узрочника на слузокожи и унутар цревних крипти колона и цекума. На епителним ћелијама уочава се деструкција митохондрија, оток митохондрија и ендоплазматског ретикулума, губитак органела и повећање густине цитоплазме. Бактерије *B. hyodysenteriae* се могу видети у епителним и пехарастим ћелијама као и у *lamina propria*. (Glock и сар., 1974; Taylor и Blakemore, 1971).

Хематолошки налаз се карактерише неконзистентним повећањем укупног броја леукоцита са „скретањем у лево“. Протеини акутне фазе су такође повећани (Jonasson и сар., 2006). Забележено је пролазно повећање седиментације, повећање концентрације фибриногена и укупног броја плазма протеина са поремећајем концентрације неких аминокиселина у крви, али без

ремећења гликемије (Jonasson и сар., 2007). Нивои натријума, хлорида и бикарбоната у крви се смањују, а забележена је значајна метаболичка ацидоза и терминална хиперкалемија (Hampson, 2012).

Дијагностика дизентерије свиња

На дизентерију се оправдано може посумњати уколико у клиничкој слици постоји карактеристична симптоматологија укључујући слузаво-хеморагичну дијареју, као и на основу карактеристичног патолошко анатомског налаза на дебелим цревима. Животиње угинуле од дизентерије су углавном у лошој кондицији или чак потпуно кахектичне, дехидриране, длака им је дуга и груба, а перинеум запрљан фецесом карактеристичног изгледа. Карактеристичан налаз муко-хеморагичног ентерита је ограничен искључиво на дебела црева (Hampson, 2012).

Диференцијална дијагноза

Већи број болести диференцијално дијагностички долази у обзир, а могу се чак дијагностификовати заједно са дизентеријом (Møller и сар., 1998; Thomson и сар., 1998). Пролиферативна ентеропатија узрокована са *L. intracellularis* клинички је слична дизентерији али су код пролиферативне ентеропатије патолошко-анатомске промене присутне на танким цревима. Салмонелоза свиња такође има сличну клиничку симптоматологију, међутим код салмонелозе свиња могу бити присутна крварења и некрозе на паренхиматозним органима и лимфним чворовима, као и промене на слузокожи танких црева. За разлику од дизентерије, за салмонелозу су карактеристичне дубоке улцеративне промене. Најлакше је искључити болест трихуриазу, јер је за њу карактерично присуство великог броја ваљкастих црва *Trichuris suis* у дебелим цревима. Езофагогастрични и гастрични улкуси, као и сва стања праћена појавом крви у фецесу, такође диференцијално дијагностички долазе у обзир, међутим оваква стања се карактеришу тамнијом, скоро црном бојом крви у фецесу, а што је резултат пробављања крви.

Интестинална спирохетоза узрокована са *B. pilosicoli* је најтежа за разликовање у односу на дизентерију свиња нарочито у блажим случајевима дизентерије (Hampson, 2012).

Изолација *Brachyspira hyodysenteriae*

За микробиолошка испитивања односно изолацију узрочника најбоље је узети узорке од неколико акутно инфицираних животиња обзиром да се велики број (10^8 - 10^9 /g) бактерија налази у фецесу и слузокожи колона. Асимптоматичне животиње нису погодне за узорковање обзиром да узрочника у детектабилном броју ($>10^3$ ћелија/mL садржаја) периодично излучују. Медикација такође смањује број *B. hyodysenteriae* испод детектабилног броја. Садржај колона је идеалан узорак мада се за дијагнозу може корисити и фецес. Уколико је болест присутна у блажој форми или је присутна субклинички потребно је прегледаи велики број животиња како би се пронашле позитивне, а препоручено је и да се ради преглед збирних узорака чиме се повећава број узрочника на детектабилан ниво (Fellström и сар., 2001).

Спирохете се могу видети у микроскопским препаратима у узорцима брисева мукозе колона бојеним по Граму, при чему се различите врсте *Brachyspira* не могу морфолошки разликовати због чега дефинитивна дијагноза подразумева идентификацију *B. hyodysenteriae* у слузокожи колона или фецесу. Јединке *Brachyspira* spp. се под светлосним микроскопом уочавају као грам-негативне бактерије карактеристичног облика. Њихов карактеристичан облик и покретљивост се такође лако уочавају под фазним микроскопом (Hampson, 2012).

Изолација *B. hyodysenteriae* захтева употребу селективних подлога и анаеробну култивацију, као и анализу фенотипских карактеристика добијених изолата. Различите подлоге као и услови за изолацију *B. hyodysenteriae* су описани у литератури при чему се селективност хранљивих подлога постиже додавањем 400 µg/mL спектиномицина и по 25 µg/mL колистина и ванкомицина. Овако припремљена подлога се назива основни, односно CVS (колистин, ванкомицин и спектиномицин) медијум за изолацију *B. hyodysenteriae* (Jenkinson и Wingar, 1981). Међутим, данас се за изолацију *B.*

hyodysenteriae највише употребљава далеко селективнији ВЈ медијум, који поред ниске концентрације три наведена антибиотика садржи и 25 µg/mL спирамицина и 12.5 µg/mL рифампицина (Kunkle и Kinyon, 1988).

На крвном агару *B. hyodysenteriae* продукује интензивну зону бета-хемолизе око зоне раста бактерија при чему се колоније *B. hyodysenteriae* тешко могу разазнати. Плоче без уочене зоне хемолизе треба додатно инкубирати у трајању до 10 дана при чему се периодично проверава раст бактерија. Међутим, и даље постоји велика могућност добијања лажно негативних резултата (неуспела изолација), а што је у највећем броју случајева условљено неадекватном манипулацијом и чувањем узорака, излагањем узорака екстремним температурама, исушивањем узорака или кашњењем у транспорту узорака до лабораторије. Врло често се изолују и друге врсте, због чега је неопходно примарну културу пречистити како би се добили појединачни изолати који се касније фенотипски карактеришу.

Методe за детекцију антигена *B. hyodysenteriae*

Методe заснованe на детекцији антигена укључују: тест флуоресцентних антитела, тест са применом фактора инхибиције раста и брзу аглутинацију на плочици. Међутим, ове методe се данас ретко користе, јер су их скоро у потпуности замениле молекуларно генетичке дијагностичке методe међу којима је најзначајније и најраспрострањеније оне које се базирају на ланчаној реакцији полимеразе (*Polymerase Chain Reaction* - PCR), односно конвенционални PCR и *real-time* PCR.

Молекуларно генетичке методe дијагностике *Brachyspira*

Амплификација одговарајућих сегмената генома *B. hyodysenteriae* применом PCR методe се корисити за детекцију, идентификацију и типизацију изолата *B. hyodysenteriae*. Најчешће се амплификују ДНК сегменти који кодирају синтезу 23S тРНК (Leser и сар., 1997), *nox* гена (Atyeo и сар., 1999) и *tlyA* гена (Fellström и сар., 2001), који се изводе на узорцима из примарне

бактеријске културе. На овај начин се резултати могу добити за 3-5 дана, а добијени изолати даље тестирати на анимикробну осетљивост и/или се може вршити типизација или субтипизација изолата.

Други начин идентификације *Brachyspira* врста, који такође укључује примену PCR методе, захтева и постаплификациону анализу PCR продуката, односно њихво третирање рестрикционим ензимима (који секу ДНК на тачно одређеним „рестрикционим местима” унутар специфичних нуклеотидних секвенци). Након третмана рестрикционим ензимима (дигестије), добијени фрагменти се анализирају путем електрофорезе. У зависности од присуства (броја и положаја) рестрикционих места у анализираном фрагменту, на гелу добијамо ДНК фрагменте различите дужине (различите *RFLP*-profile). На основу позиционирања интересних фрагмената врши се идентификација врста. У овом случају циљане секвенце ДНК се налазе у генима одговорних за синтезу у 16S рРНК, (Stanton и сар. 1997), 23s рРНК (Barcellos и сар., 2000) и *nox* гену (Rohde и сар., 2002). Постоје и тзв. дуплекс PCR тестови (са два пара прајмера) који омогућавају истовремену идентификацију, односно диференцијацију *B. hyodysenteriae* и *B. pilosicoli* у узорцима ДНК из фецеса (La и сар., 2003). Такође, мултиплекс формат RT-PCR реакције је описан и он омогућава истовремену идентификацију *Brachyspira* врста и *Lawsonia intracellularis* (Song и Hampson, 2009; Willems и Reiner, 2010).

Серолошка дијагностика дизентерије свиња

Описано је неколико серолошких тестова за идентификацију *B. hyodysenteriae* на нивоу запата, али који нису комерцијално доступни у форми дијагностичког сета (La и Hampson, 2001) и изводе се у свега неколико лабораторија у свету. Тестови нису направљени на принципу дијагностике до нивоа врсте (нису *species*-специфични) због чега их одликује ниска специфичност или сензитивност. ELISA тест који корисити LOS као антиген се показао као солидан тест за идентификацију *B. hyodysenteriae* на нивоу запата, али није примењљив за дијагностику код индивидуалних животиња оболелих од дизентерије (Joens и сар., 1982). Такође, ELISA тест који корисити ЛПС као антиген захтева информације о серотипу *B. hyodysenteriae* који је присутан на

фарми. Од недавно, постоји ELISA тест који корисити Vhlp29.7 као антиген, а примењују се и различити тестови са рекомбинантим антигенима (La и сар., 2009а).

Имунитет код дизентерије свиња

У току трајања болести забележене су промене у нивоу антитела као и реактивност ћелијског имунског одговора, мада је значај ове реактивности још увек нејасан. Ниво серумског имуноглобулина G класе (IgG) корелира са дужином трајања клиничке слике болести (присуства дијареје), док истовремено повећање нивоа имуноглобулина класе A (IgA) у колону говори у прилог скорашњој инфекцији (Rees и сар., 1989b). Ни један ни други детектовани ниво антитела не корелира са протективним титром (Joens и сар., 1982; Rees и сар., 1989b). Животиње које су преболеле инфекцију могу бити само делимично заштићене од поновне инфекције у времену до 17 недеља, при томе један број животиња (7–43%) и даље остаје незаштићен (Rees и сар., 1989а), а код ~10% животиња заштита настаје тек након реинфекције (Rees и сар., 1989а). Имунитет је делимично серотип-специфичан, усмерен на LOS антиген (Joens и сар., 1983).

Комплемент и серумски имуни одговор имају улогу у елиминацији *B. hyodysenteriae* у колону (Joens и сар., 1985). Ћелијски имуни одговор такође има улогу у заштити тако што доводи до инхибиције миграције леукоцита, развоја хиперсензитивности (тип IV) и пролиферације Т лимфоцита на антигене *B. hyodysenteriae* код животиња у реконвалесцентној фази *fazi* (Jenkins и сар., 1982). Пролиферација CD8 α је забележена код животиња у фази опоравка (Waters и сар., 2000). Поредџи популацију циркулишућих леукоцита и субпопулацију лимфоцита код оболелих и здравих животиња Jonasson и сар. (2004) закључују да $\gamma\delta$ T и CD8+ лимфоцити могу бити индикатор појаве инфекције, док моноцити и CD4+ CD8+ Т лимфоцити представљају главне лимфоците. Повећање броја $\gamma\delta$ T лимфоцита и специфичних антитела је забележено током фазе опоравка (Jonasson и сар., 2006). Након експерименталне инфекције или након вакцинације са бактеријским вакцинама код инфицираних/вакцинисаних животиња је забележен делимичан протективни

одговор против других серотипова *B. hyodysenteriae* (Kennedy и сар. 1992; Parizek и сар. 1985). Међутим, није познато да ли инфекција са једном врстом *Brachyspira* пружа било какву заштиту против инфекције са другим *Brachyspira* врстама. Дизентерија се изузетно ретко појављује код прасади на сиси, а што се делимично приписује присуству матерналних антитела (Zimmerman и сар., 2012; Hampson, 2012).

Лечење и превенција дизентерије свиња

Само неколико антибиотика је ефикасно у лечењу дизентерије свиња. То су лекови из групе плеуромутилина (тиамулин и валнемулин), макролида (тилозин и тилвалозин) и линкозамида (линкомицин). Међутим, изолати *B. hyodysenteriae* показују забрињавајући степен резистенције на плеуромутилине као најефикасније антибиотске препарате у лечењу ове афекције. Због тога је препорука да се плеуромутилини употребљавају искључиво за специфичну терапију и/или за ерадикацију обољења када примена других антибиотских лекова и/или друге мере нису ефикасне у санирању ове афекције. При томе, изузетно је важно установити осетљивост изолата *B. hyodysenteriae* на све антибиотике установљавањем минималне инхибиторне концентрације (*minimum inhibitory concentration* - МИС) лека.

Код клиничке форме обољења (интензивна профузна слузаво-крвава дијареја) неопходна је *i/m* апликација лекова у трајању од најмање 3 до 5 дана. Међутим, у већини случајева се примена лекова врши преко воде за пиће у трајању од 5 до 7 дана. Уколико апликација лекова преко воде за пиће није могућа, врши се медикација преко хране у трајању од најмање 7 до 10 дана упркос томе што неке или већина животиња могу показивати различит степен инапетенце. За све време трајања болести, као и за време спровођења терапије, животиње треба да имају довољну количину воде на располагању. Такође, код теже оболелих животиња које показују знаке дихидратације индикована је и *per/os* примена електролита у комбинацији са глукозом. Након терапије акутне форме обољења обавезна је медикација преко хране са применом лека у субтерапијским дозама у трајању од најмање 2 до 4 недеље.

Лекови који се најчешће користе у лечењу дизентерије свиња су плеуромутилини (тиамулин и валнемулин) тилозин и линкомицин. Примена ових лекова, као и нежељени ефекти ових лекова су приказани у књизи Hampson (2012). На основу фармакокинетичких својстава различитих антибиотских лекова, као и резултата испитивања осетљивости изолата *B. hyodysenteriae*, плеуромутилини су се показали као најефикаснији лекови у лечењу и превентивној медикацији дизентерије. Међутим, смањена осетљивост изолата *B. hyodysenteriae* на тиамулин је забележена у великом броју земаља. Дуготрајна примена тиамулина фаворизује ширење сојева (клонова) *B. hyodysenteriae* са смањеном осетљивошћу на плеуромутилине (Karlsson и сар. 2004), због чега се у циљу смањења ризика појаве сојева резистентних на плеуромутилине обавезно врши испитивање осетљивости изолата *B. hyodysenteriae* на све антибиотске лекове који су ефикасни у лечењу и превенцији дизентерије. Правило је да уколико се забележи осетљивост на друге антибиотске лекове, у лечењу и превентивној медикацији прво треба применити њих. Резистенција на тилозин и линкомицин је релативно честа код свих *Brachyspira* врста (Hommeze и сар., 1998; Karlsson и сар., 2003). Резистенција на макролиде и линкозамиде је резултат појединачних мутација у 23S рРНК гену, а према неким подацима резистенција на тилозин се може развити у року од 2 недеље (Karlsson и сар., 1999). Такође, релативно од скоро бележи се пораст изолата *B. hyodysenteriae* који показују резистенцију на све антидизентеричне лекове (мултипла резистенција). Ова појава уочена је широм света (Duinhof и сар., 2008; Ohya и Sueyoshi, 2010; Hidalgo и сар., 2011; Šperling и сар., 2011). Интересантно, најдраматичније повећање резистенције забележено је управо код бактерија рода *Brachyspira* (Pyyölä и сар., 2014).

Acetylisovaleryltylosin (Aivlosin) је антибиотик новијег датума, а представља модификацију једног старијег антибиотика који се успешно користити у лечењу и превенцији дизентерије применом кроз храну. Такође, други антибиотски лекови се могу користити како у лечењу тако и у превентиви дизентерије, а укључују: бацитрацин, спирамицин, гентамицин, диметридазол, ронидазол, виргиниамицин. На жалост, забележен је значајан степен резистенције на већину наведених препарата због чега се данас скоро и не користе у лечењу и превенирању дизентерије. Поред тога, фармакокинетичка својства већине поменутих антибиотских препарата су таква да достижу

релативно ниске концентрације у гастроинтестиналном тракту, што их чини погодним само за профилактичке сврхе (de Graaf и сар., 1988). Такође, забележено је да карбадокс и метронидазол узрокују појачану експресију ГТА чиме се повећава могућност преношења гена резистенције између различитих сојева *B. hyodysenteriae* (Stanton и сар., 2008).

Приликом примене плеуромутилина у лечењу и превенирању дизентерије веома важна је њихова инкопатибилност са јонофорним антибиотцима (монензим, салиномицин, наразун) који се у неким земљама (УСА) још увек користе као промотори раста. Наиме, плеуромутилини потенцирају тровање јонофорним антибиотцима интерферирајући са метаболизмом, односно екскрецијом јонофора. Истовремена примена јонофорних антибиотика и плеуромутилина доводи до повећања концентрације резидуа јонофора због инхибиције њихове биотрансформације узроковане плеуромутилинима. Наиме, плеуромутилини формирају стабилне везе са интермедијарним оксидативним метаболичким комплексима цитохрома P450 због чега истовремена администрација плеуромутилина и лекова код којих се примарна биотрансформација одвија оксидацијом у цитхрому P4503A, као што је то случај са јонофорним антибиотцима, доводи до повећања концентрације њихових резидуа. Јонофори су растворљиви у мастима и кроз ћелијску мембрану транспортују натријум у ћелију. Висока концентрација интрацелуларног натријума води ка повећању концентрације интрацелуларног калцијума која узрокује: едем митохондрија, ослобађање катехоламина и учесталије контракције мишићних ћелија укључујући и миоците (Rátz и сар., 1997; Carpenter и сар., 2005).

Као што је претходно наведено, у лечењу дизентерије могуће је постићи добре резултате применом неколико антидизентеричних средстава. Међутим, њихова неадекватна примена, погрешан избор, грешке у дозирању и дужини примене, могу довести до перзистирања дизентерије у различитим облицима („закасна дизентерија“, „абортивна дизентерија“, „погоршана“ дизентерија“), а могуће је да настане и друго патолошко стање, као резултат бактеријске дисбиозе.

„Закасну дизентерију“ карактерише успорен ток, услед пролонгиране инкубације, јер аплицирани лек не делује ефикасно, само успори процес, а инфекције уследи.

„Абортивну дизентерију“ карактерише зелено-слузави пролив без примеса крви, али уз богат налаз *B. hyodysenteriae* у фецесу. Обично се јавља код субдозирања или прекратког периода апликације лека.

„Погоршана дизентерија“ обично настаје након примене антидизентерика према којима су узрочници стекли знатну или потпуну резистенцију, па испољавају своју већу агресивност (Lončarević и сар., 1997).

Карбадокс, олаквидокс и деривати олаквидокса су забрањени у терапији деизентерије јер је утврђено да испољавају негативне ефекте, пре свега цитотоксични и генотоксични (Marković и сар., 2000a,b; Chen и сар., 2009). У већим дозама генотоксични и мутагени ефекти доказани су и за ипронидазол и тиамулин (Marković и сар., 2002a,b, 2004).

Контрола дизентерије на фарми

Стриктна примена принципа „све унутра/све напоље“ и доследна примена свих зоохигијенских мера може дати успех у ограничавању ширења инфекције и спречавању појаве реинфекција у запату. У случају појаве дизентерије у појединачним објектима за смештај свиња, након спроведене медијације, за заустављање ширења и прекид инфекције најбоље је изместити све животиње изван објекта и извршити темељно механичко чишћење, санитарно прање, дезинфекцију и „одмор“ објекта. Радници ангажовани на овим пословима треба да имају засебну одећу, обућу, да користе посебан алат и прибор који се након сваког изношења из објекта темељно дезинфикује. На улазу у сваки објекат неопходно је поставити дезинфекционе баријере, а дезинфекционо средство редовно освежавати. Пре дезинфекције, неопходно је извршити темељно механичко чишћење обуће и одеће од крупнијих нечистоћа. Како се дизентерија неретко појављује након излагања животиња стресу узрокованог манипулацијом животиња, прекапацитираношћу објеката за смештај, транспортом, наглим променама спољашње и унутрашње температуре, променама у начину исхране или у композицији готове смеше за исхрану и др., стрес треба свести на најмању могућу меру. Мишеви и пацови могу бити резервоари инфекције због чега је неопходна имплементација ефикасних мера за контролу њихових популација на комплетној фарми.

Међутим, и поред свих предузетих мера, практично је немогуће у потпуности спречити механичко ширење *B. hyodysenteriae* контаминираном материјалу од стране птица, инсеката и других механичких вектора на фарми (Zimmerman и сар., 2012).

Превенција уношења *B. hyodysenteriae* на фарму, превенција избијања дизентерије на фарми и елиминација *B. hyodysenteriae* са фарме

Фарме које су затворене, односно које имају такву структуру запата који им омогућава минималан „улазак“ нових животиња на фарму уз предузимање свих мера за превенцију контаминације, имају веће шансе да остану слободне од ове инфекције. Увођење у запат новонабављених животиња представља највећи ризик за уношење инфекције. Све новонабављене животиње треба да прођу карантин од најмање 3 недеље и да буду превентивно терапирани антидизентеричним лековима. Инфективни материјал попут обуће, одеће, возила, посетилаца и др. такође представља ризик за уношење инфекције на фарму.

У зависности од структуре запата, технологије фарме и економске анализе, ерадикација дизентерије се може извести на неколико начина. Програми за ерадикацију су различити, а подразумевају: интензивну медикацију свих свиња на фарми за краћи период, увођење тзв. медикације рано залучене прасади и прелазак на тзв. *multisite* („на више места“) систем производње. Наведене мере треба да прати паралелно спровођење програма постепеног пражњења свих објеката за смештај свиња на фарми, али и стриктних зоохигијенских мера, након чега се у запат уводе третиране новонабављене животиње. Нарочит напор је неопходно уложити у едукацију комплетног особља у циљу правилног извођења свих наведених поступака. Уопштено, програм ерадикације је далеко теже провести на већим и комплекснијим фармама. Тако су Wood и Lysons (1988) проценили да је успех ерадикације негде око 80-90%. Ефекте ерадикације треба пажљиво одмерити након 6 до 12 месеци спровођења мера, пре свега на основу повећања производних параметара и смањења утрошка лекова (Windsor и Simmons 1981; Wood и Lysons 1988). Потпуна депопулација, темељно чишћење, дезинфекција

и насељавање са новим животињама без дизентерије су понекад једини начин елиминације *B. hyodysenteriae*, али то треба спровести тек након детаљне економске анализе (Wood и Lysons 1988). Ерадикација дизентерије без потпуне депопулације је далеко исплативија варијанта (Polson и сар. 1992), а вероватноћа успеха ерадикације зависи умногоме од избора мера и њиховог спровођења.

Елиминацију дизентерије на фарми треба спроводити искључиво у случајевима када постоји ефикасан антибиотик против *B. hyodysenteriae*. Такође, важно је обезбедити довољан број животиња слободних од дизентерије за замену или извршити изолацију и медикацију животиња пре него што се врате у запат. Општи програм ерадикације подразумева следеће мере: дијагноза дизентерије треба бити лабораторијски доказана; неколико изолата треба тестирати на антимикробну осетљивост утврђивањем МИС за антибиотике који планирају да се употребе у ерадикацији; треба извршити типизацију изолата како би се установило евентуално приситво више различитих сојева на фарми. На фармама са континуираним током производње на једном месту, требало би променити начин узгоја тако да буде „на више места“ (идеално би било да се узгој залучене прасади и товљеника одвија на више локација). Ерадикацију треба спроводити искључиво по топлом времену (у летњим месецима) обзиром да *B. hyodysenteriae* краће преживљава на вишим температурама. Број свиња на фарми треба свести на оптималан број. Неопходно је обезбедити контролу популације глодара и инсеката, као и све мере за спречавање контакта са птицама. Треба затворити све псе и мачке на фарми. Све објекте, укључујући инсталирану опрему у објектима, треба темељно механички очистити, санитарно опрати користећи топлу воду под притиском и обавити темељну дезинфекцију. Објекте након дезинфекције треба „одморити“ у времену од најмање 14 дана. Потребно је очистити, опрати и дезинфиковати све изводне канале и канализацију. Објекте на фарми (попут рампе за утовар, испусте и др.) треба такође темељно механички очистити, опрати и дезинфиковати, а најбоље би било изместити на друго место. Органски материјал треба спалити, закопати или оставити на отвореном неколико месеци. Све назимице, крмаче и нерастове треба третирати антидизентеричним лековима преко воде или хране у трајању од најмање 14 дана, након чега их треба вратити у чисте објекте. Прасад која се опраси током трајања програма

ерадикације, треба одмах залучити и третирати истим лековима који се користе у ерадикацији. Прасад која се опрасе након завршеног медикаментозног третмана крмача могу се одгајати на том месту (Hampson, 2012).

Вакцине против *B. hyodysenteriae*

Бактерин вакцине против *B. hyodysenteriae* су доступне само у неким земљама, а вакцине могу обезбедити само одређен степен заштите (Diego и сар. 1995). На жалост све вакцине су LOS серогруп-специфичне што захтева композицију вакцине од аутохтоних или мултивалентних сојева. Израда оваквих вакцина је због саме пророде узрочника (тешка изолација и манипулација са изолатима) захтевна и релативно скупа, због чега је тешко обезбедити веће количине вакцине. Шта више, у једном истраживању је забележен потпуни неуспех у превенцији појаве болести применом оваквих вакцина, па чак и егзацербација дизентерије (Olson и сар. 1994). Неке комерцијалне вакцине припремљене ензимском дигестијом бактерина обезбеђују бољу заштиту у односу на класичне бактерин вакцине (Waters и сар. 1999). Авирулентни или слабо вирлентни сојеви *B. hyodysenteriae* су такође били употребљени за припрему вакцина (Hudson и сар. 1976), некада комбиновани и са бактерин вакцинама (Lysons и сар. 1986). Модификовани сојеви *B. hyodysenteriae* са мутираним генима одговорним за покретљивост (Rosey и сар. 1996), хемолизу (Nyatt и сар. 1994) и заштиту од токсичног дејства кисеоника (Stanton и сар. 1999) су такође кориштени за припрему ефикасне вакцине. Међутим, показало се да овакви (мутирани) сојеви *B. hyodysenteriae* имају смањењу способност колонизације и да обезбеђују само делимичну заштиту. Примена рекомбинантних сојева *B. hyodysenteriae* са 38 kDa флагеларним протеином као вакциналним антигеном није показала ефикасност у превенирању колонизације колоне (Gabe и сар. 1995), међутим, Bhlp29.7 спољашње липопротеинске мембране *B. hyodysenteriae* као имуноген је смањио инциденцу појаве дизентерије за 50% (La и сар. 2004). Слично, применом других рекомбинантних протеина као имуногена у вакцини је имало сличан

ниво заштите у експерименталним инфекцијама (Song и сар. 2009), што указује да је овакав приступ у проналажењу адекватне вакцине валидан.

Фитогени адитиви

Многи препарати на биљној бази препоручују се као алтернатива антибиотцима у узгоју домаћих животиња. Разлог за то је њихов широк спектар активности од којих су најзначајнија антимиembroно, антиинфламаторно и антиоксидативно дејство (Vondruskova и сар., 2010; Nashemi и Davoodi, 2011), без нежељених споредних ефеката који се јављају при примени антибиотика, нарочито при дужој употреби (појава резистенције узрочника) и одсуство каренце. Препарати биљног порекла која имају позитиван утицај на здравље животиња и сточарску производњу називају се фитогени адитиви (Gregačević и сар., 2014). У узгоју свиња бројни фитогени адитиви показали су се ефикасним у контроли цревних бактеријских инфекција, односно очувању цревне микробиоте и дигестивне функције и превенцији дијареје, али и у јачању имуног одговора, побољшању општег здравственог стања и производних параметара, па самим тим и квалитета намирница анималног порекла (Manzanilla et al., 2004; Namkung et al., 2004; Kroismaug и сар., 2008; Windisch и сар., 2008; Li et al., 2012; Gregačević и сар., 2014; Zeng и сар., 2015; Omonijo и сар., 2017; Petrujkić и сар., 2018; Drašković и сар., 2018).

Међутим, када је реч о дизентерији свиња, ефикасност биљних састојака против *B. hyodysenteriae* до сада је анализирана само у четири истраживања (Jakab и сар., 2011; Vande Maele и сар., 2016; Kutasi и сар., 2016; de Nova и сар., 2017) и у свима *in vitro* (диск дифузионом методом на агару). У првом је испитана антибактеријска активност екстракта култивисане мајкине душице (*Thymus vulgaris*) и семена рогача (*Ceratonia siliqua*) и њихових комбинација (Jakab и сар., 2011). Анализирана су различите концентрације (разблажења) и одређивана минимална инхибиторна концентрација (*minimum inhibitory concentrations* – МИС. Концентрације екстраката обе биљке које су *in vitro* показале најбоље резултате омогућиле су производњу комбинације за коју се сматрало да може показати резултате и *in vivo*, те направљен фитогени адитив

за пилот истраживање. Прасад је храњена тим адитивом на пет фарми које су имале дугогодишњи проблем са дизентеријом. Резултати су показали да је адитив ефикасно смањено трошкове лечења, побољшао прираст и конверзију (Jakab и сар., 2011). Међутим, у том истраживању нема резултата анализе фецеса прасади, нити је фецес анализиран на присуство *B. hyodysenteriae*. У другом истраживању, истом *in vitro* методом, процењивано је дејство 15 супстанци на *B. hyodysenteriae*, четири састојка етарских уља (цинам-алдехид, тимол, еугенол и карвакрол) и 11 органских киселина (мравља, лимунска, бензоева, млечна, сирћетна, пропионска, бутиринска, капроинска, каприлинска, капринска, лауринска). Најбољи антибактеријски ефекат према *B. hyodysenteriae* показали су цинамалдехид и лауринска киселина примењене појединачно. Од седам комбинација двеју супстанци, већина је испољила адитивни ефекат, док је комбинација тимола и карвакрола испољила синергистички ефекат (Vande Maele и сар., 2016). У трећем раду, такође *in vitro*, испитивана је и доказана бактерицидна ефикасност воденог екстракта баштенске мајкине душице (*Thymus vulgaris*) према *B. hyodysenteriae*. Иако је доказано да испитивани екстракт инхибира свих шест сојева *B. hyodysenteriae* у култури, неопходно је да се потврди бактерицидни ефекат истог екстракта у *in vivo* експерименту (Kutasi и сар., 2016). У четвртом испитивању, такође *in vitro*, испитивана је антимикуробна активност комерцијалног екстракта цитрусног воћа (BIOCITRO), који се користи као фитогени адитив, према *B. hyodysenteriae*. На основу резултата закључено је да BIOCITRO представља задовољавајућу алтернативу антибиотицима у контроли дизентерије свиња (de Nova и сар., 2017).

На основу свега наведеног, до сада није обављено ниједно клиничко, односно *in vivo* испитивање дејства фитогених адитива на прасад оболелу од дизентерије, а да је при томе *B. hyodysenteriae* изолована из фецеса експерименталне прасади било којом методом и да је ефикасност фитогеног адитива процењивана на основу клиничких знакова.

У складу са тим, одабран је да предмет ове докторске дисертације буде *in vivo* испитивање ефеката два фитогена адитива (Patente-Herba® и Patente-Herba® Plus) у превенцији и контроли дизентерије свиња уз процену производних резултата код одлучене прасади природно инфициране са *B. hyodysenteriae*.

3. ЦИЉ И ЗАДАЦИ

Циљ овог рада је утврђивање ефикасности два фитогена адитива (Patente Herba[®] и Patente Herba[®] Plus) у контроли дизентерије свиња код одлучене прасади природно инфициране са *Brachyspira hyodysenteriae*.

За постизање наведеног циља постављени су следећи задаци:

1. успостављање протокола за испитивање ефикасности фитогених адитива у контроли дизентерије свиња применом молекуларно генетичких и микробиолошких метода идентификације *B. hyodysenteriae* и макроскопском оценом фецеса;
2. процена ефикасности и безбедности два фитогена адитива (Patente Herba[®] и Patente Herba[®] Plus) у контроли дизентерије свиња анализом присуства узрочника у фецесу природно инфициране прасади;
3. поређење позитивних и негативних ефеката наведених фитогених адитива и антибиотика тиамулина

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Испитивани препарати и начин њихове примене

Експеримент је обухватио испитивање ефеката два комерцијално доступна фитогена адитива Patente Herba[®] и Patente Herba[®] Plus (Patent Co. DOO, Мишићево, Србија). Фитогени адитив Patente Herba[®] се састоји од екстракта биљака (*Castanea sativa* – питоми кестен, *Rosmarinus officinalis* - рузмарин, *Thymus vulgaris* - тимијан, *Origanum vulgare* - оригано, *Allium sativum* – бели лук, *Eucalyptus globules* - еукалиптус), етарских уља (тимол, карвакрол, еукалиптол, пара-цимен, ментол и еугенол) и клиноптилолита, док фитогени адитив Patente Herba[®] Plus има све састојке као и Patente Herba[®] уз додаток лизозима и никотинамида. Оба фитогена адитива су додавана у сточну храну у складу са препорукама произвођача, односно Patente Herba[®] у количини од 2 kg/t потпуне крмне смеше, а Patente Herba[®] Plus у количини од 1 kg/t потпуне крмне смеше свакодневно током тронедељног трајања експеримента, односно почев од 1. (дан након 0. дана) до 21. дана третмана.

Антибиотик тиамулин (Tiamulin - P - 10%, Vetmedic d.o.o., Вршац, Србија) који се користи у лечењу и контроли дизентерије свиња, одабран је за третман групе прасади у позитивној контроли. Антибиотик је апликован *per/os* преко хране, у дозама препорученим од стране произвођача.

Животиње и формирање експерименталних група

У периоду између 2016. и 2018. године на фарми свиња Института за сточарство Београд - Земун спроведен је експеримент на клинички здравим одлученим прасадима старости седам недеља. Истраживање је обухватало формирање четири групе животиња првог дана експеримента (који се

обележава као 0. дан, јер је то дан пре почетка давања фитогених адитива). Свака група садржала је по 16 прасади мушког пола, тако да је укупан број прасади у експерименту био 64. Прасад је узета из 16 легла и након обележавања и мерења, обављено је њихово распоређивање у четири експерименталне групе поштујући принцип да се из сваког легла по једно прасе распореди у сваку групу. На овај начин, формиране су четири групе од по 16 прасади, при чему свака група била сачињена од прасади пореклом од 16 крмача.

Експерименталне групе прасади биле су смештене у боксове који су физички били одвојени, тако што се између свака два експериментална бокса налазио један празан. Све четири групе прасади добијале су потпуну крмну смешу која је у потпуности задовољавала потребе за дату категорију животиња (NRC, 2012). Поред поменуте смеше, једној групи даван је храном адитив Patente Herba[®] (PH), другој је даван храном адитив Patente Herba[®] Plus (PHP), трећа група је храном добијала антибиотик тиамулин (Tiamulin - P - 10%) и представљала је позитивну контролу (ТК+), док је четврта група добијала само потпуну крмну смешу и представљала је негативну контролу (К-), табела 1.

Табела 1. Експерименталне групе

Ознака групе	Опис експерименталне групе
PH	Група која је добијала храном препарат Patente Herba [®]
PHP	Група која је добијала храном препарат Patente Herba [®] Plus
ТК+	Група која је добијала храном антибиотик тиамулин Tiamulin - P - 10% (позитивна контрола)
К-	Група која је добијала само потпуну крмну смешу (негативна контрола)

Прикупљање узорака

Узорци фецеса за анализу присуства бактерије *B. hyodysenteriae* били су прикупљани на дан када су се формирале групе (0. дан, односно дан пре

почетка давања фитогених адитива), 7, 14. и 21. дана експеримента. За молекуларно генетичку детекцију *B. hyodysenteriae* узорци фецеса били су узимани директно из ректума сваког појединачног прасета, док су за микробиолошку детекцију прикупљани збирни узорци фецеса од сваке групе, односно из сваког бокса. Укупно 256 индивидуалних и 16 збирних узорака је прикупљено и анализирано.

Молекуларно генетичка идентификација *B. hyodysenteriae*

○ *Изолација ДНК B. hyodysenteriae* из фецеса

Изолација ДНК *B. hyodysenteriae* из фецеса експерименталних животиња обављена је помоћу комерцијалног сета „*QIAamp*[®] *DNA Stool Mini Kit*“ (Cat. No. 51504, QIAGEN, Germany) по следећем протоколу:

1. Измери се 180 - 220 mg фецеса и стави у епрувету запремине 2 ml која треба бити постављена на леду;
2. Додаје се 1,4 ml *Buffer ASL* за сваки узорак фецеса. Следи вортексовање у трајању од 1. минута, односно док се узорак фецеса не хомогенизује у потпуности;
3. Затим се суспензија инкубира 5 минута на 70°C;
4. Потом се узорак хомогенизује на вортекс апарату 15 секунди, а након тога центрифугира на максималној брзини 1 минут до формирања партикула талоба;
5. Пребацује се 1,2 ml супернатанта у нову епрувету запремине 2 ml и одбацује талоб;
6. Додаје се по 1 таблета *InhibitEX Tablet* по сваком узорку и хомогенизује се на вортекс апарату непрекидно 1 минут или док се таблета потпуно не растопи, а затим се узорак инкубира 1 минут на собној температури како би се инхибиторима омогућило апсорбовање на *InhibitEX matrix*;
7. Узорак се центрифугира на максималној брзини 3 минута, да би се инхибитори талоба везали за *InhibitEX matrix*;

8. Пребацује се сав супернатант у нову епрувету запремине 1,5 ml и одбацује талог. Узорак се центрифугира на максималној брзини у трајању од 3 минута;
9. Затим се пребације 15 μ l протеиназе К у нову епрувету запремине 1,5 ml, а након тога се пребацује 200 μ l супернатанта из корака 8 у епрувету запремине 1,5 ml која већ садржи протеиназу К;
10. Додаје се 200 μ l *Buffer AL* и хомогенизује се на вортекс апарату 15 секунди и инкубирати 10 минута на 70°C;
11. Потом се додаје 200 μ l етанола (96 – 100%) у лизат, добро промеша на вортекс апарату и кратко центрифугира како би се уклониле капљице са унутрашње стране поклопаца;
12. Обележава се поклопац нове *QIAamp spin column* и поставља се у сабирну епрувету запремине 2 ml. Пажљиво се пребацује целокупни лизат из корака 13 у *QIAamp spin column* без влажења ивица. Затвара се поклопац и центрифугира на максималној брзини 1 минут. Следи постављање *QIAamp spin column* у нову сабирну епрувету запремине 2 ml, а стара сабирна епрувета са филтратом се одбацује;
13. Пажљиво се отвара *QIAamp spin column* и додаје 500 μ l *Buffer AW1*, затвара се поклопац и центрифугира се на максималној брзини 1 минут. Потом се поставља *QIAamp spin column* у нову сабирну епрувету запремине 2 ml, а стара сабирна епрувета са филтратом се одбацује;
14. Поново се пажљиво отвара *QIAamp spin column* и додаје 500 μ l *Buffer AW2*. Затвара се поклопац и центрифугира на максималној брзини 3 минута, након чега се одбацује сабирна епрувета са филтратом;
15. Потом се поставља *QIAamp spin column* у нову сабирну епрувету запремине 2 ml, а одбацује стара сабирна епрувета са филтратом и центрифугира на максималној брзини 1 минут;
16. Пребацује се *QIAamp spin column* у нову обележену епрувету запремине 1,5 ml и пипетира 200 μ l *Buffer AE* директно на мембрану *QIAamp spin column*. Затвора се поклопац и инкубира 1 минут на собној температури, а затим центрифугира на максималној брзини 1 минут до елуције ДНК.

Након изолације, ДНК је чувана на -20°C . Концентрација изоловане ДНК мерена је на апарату BioSpec-nano Spectrophotometer (BioSpec-nano, Shimadzu, Kyoto, Japan).

○ **PCR реакција**

Да би испитали присуство бактерије *B. hyodysenteriae* и утврдили ефекте два фитогена адитива (Patente Herba[®] и Patente Herba[®] Plus) у контроли дизентерије свиња коришћен је следећи пар олиго-нуклеотидних прајмера:

- H1 (5'-ACTAAAGATCCTGATGTATTTG-3') и
- H2 (5'-СТААТАААСГТСТГСТГС- 3')

који омогућавају умножавање специфичног сегмента NADH оксидазе (пох) гена бактерије *B. hyodysenteriae* величине 354 bp (La и сар., 2003).

За извођење PCR амплификације коришћен је комерцијални сет хемикалија „HotStarTaq[®] DNA polymerase” (QIAGEN, Germany) по упутству произвођача. Реакције амплификације обављене су на апарату „MultiGene Gradient Thermal Cycler“ (Labnet International, Inc., USA). Реакциона смеша запремине 25 μl је садржала: 1X PCR buffer (која садржи 1,5mM MgCl_2), 1,25 U HotStarTaq DNA polymerase, 0,1 mM сваког dNTP (Promega, Madison, WI, USA), 0,2 μM сваког прајмера (H1 и H2) и 2,5 μl изоловане ДНК (La и сар., 2006).

Термални протокол PCR реакције

1.	95°C	15 мин		Активација HotStartTaq ДНК полимеразе
2.	95°C	30 сек	} 35 циклуса	Денатурација Хибридизација ДНК екстензија
3.	58°C	90 сек		
4.	68°C	2 мин		
5.	68°C	10 мин		

Електрофореза и визуелизација PCR продукта

Продукти PCR амплификације су раздвојени електрофорезом на агарозном гелу. Једнопроцентни агарозни гел припремљен је растварањем 0,4 g агарозе (Serva – Agarose Serva for DNA Electroforesis Analytical Grade. Germany) и 40 ml 1x TAE пуфера (Tris-acetate, EDTA). Агароза се кува у TAE пуферу 90 секунди на 450W (у микроталасној пећници Whirlpool model M 541) и затим хлади ротацијом магнета на магнетнетној мешалици (VELP scientifica – ARE Heating magnetic stirrer, Velp scientifica, Italy) до температуре одговарајуће за прихватање посуде руком. Након тога се разлива гел у кадицу за електрофорезу у коју је претходно постављен чешаљ за формирање базенчића на гелу и хлади током десетак минута на собној температури.

PCR продукти су мешани са 1 μ l боје 6x *Loading Dye Solution* (Fermentas) на парафилму и након хлађења гела нанети су у сваки базенчић гела. У граничне базенчиће нането је 2 μ l ДНК маркера O'RangeRuler™ 100bpDNA Ladder, Fermentas, USA) који је такође помешан на парфилму са 1 μ l боје. Гел је преливен са 50 ml 1x TAE пуфера. Електрофореза се одвијала при струји јачине 50 mA и напону од 50 V у трајању од 45 минута (MINIeasy Electrophoresis Unit N817.1, Carl Roth, Germany). Као негативна контрола коришћена је и вода (H₂O), док је као позитивна контрола коришћен претходно потврђен узорак *B. hyodysenteriae*.

За визуелизацију молекула ДНК у гелу коришћен је етидијум бромид који се интеркалира између ланаца ДНК молекула и флуоресцира када се осветли UV светлом. Визуелизација молекула ДНК у агарозном гелу омогућена је бојењем гела након електрофорезе у раствору од 20 μ l етидијум бромида у 200 ml дестиловане воде, током 15 минута, док је обезбојавање гела вршено дестилованом водом у трајању од 10 минута. Након тога је гел посматран под UV светлом на трансилуминатору ETX-20.C 254 nm (Vilber Lourmat, France).

o *Real-time PCR реакција*

За амплификацију бактеријске ДНК у real-time PCR поступку коришћен је комерцијални сет хемикалија за real-time PCR „KAPA SYBR®

FAST Master Mix (2X) Universal” (KAPA Biosystems, MA, USA). Реакције амплификације изведене су на апарату „Rotor-Gene Q 5plex“ (QIAGEN, Germany). За PCR идентификацију *B. hyodysenteriae* кориштен је пар олигонуклеотидних прајмера који омогућавају умножавање специфичног сегмента *tcpA* гена *B. hyodysenteriae* (Davis и сар., 2005):

- RT1 (5’-GCAGAAATTTTATGGAACCTTAGACCAG-3’) и
- RT2 (5’-TCCTGTAGCTGCCGATTCTTTAA-3’)

Реакциона смеша запремине 25 µl садржала је: 12,5 µl KAPA SYBR® FAST Master Mix (2X) Universal” (KAPA Biosystems, MA, USA), 0,8 µM сваког прајмера, 5,5 µl H₂O и 5 µl изоловане ДНК.

Термални протокол real-time PCR реакције

1. 95°C	10 мин		Активација
2. 95°C	15 сек	} 45 циклуса	Денатурација
3. 60°C	30 сек		Хибридизација
4. 72°C	30 сек		ДНК екстензија

Визуелизација амплификованих продуката је омогућена бележењем нивоа флуоресценције у виду специфичних дијаграма уз помоћ компјутерског софтвера (Rotor-Gene Q Series Software) који је обезбеђен од стране произвођача апарата „Rotor-Gene Q 5plex“.

Осим за детекцију ДНК *B. hyodysenteriae*, real-time PCR (qPCR) је у овом раду коришћен и за квантификацију ДНК ове бактерије у циљу анализе могућности примене ове методе у процени степена инфекције бактеријом *B. hyodysenteriae* и процени ефикасности препарата (у нашем случају адитива Patente Herba® и Patente Herba® Plus) у контроли дизентерије свиња.

Микробиолошка изолација *B. hyodysenteriae*

Изолација *B. hyodysenteriae* је извршена на триптоза соја агару (*Tryptose Soya Agar* - TSA) са додатком 5% дефибринисане овчије крви, спектиномицина (200 mg/l), ванкомицина (50 mg/l), рифампицина (12,5 mg/l) и колистина (12,5 mg/l), због чега је комплетан акроним назива поглосе TSA-SVRC. Након инокулације, плоче су инкубиране у анаеробној атмосфери у трајању од 5-7 дана. Након инкубације, из зона хемолитичног раста је прикупљен део агара, растворен у физиолошком раствору и обојен по Граму. Посматрањем под микроскопом је извршено испитивање морфолошких особина изолованих спирохета. Спирохете за које смо предпоставили да су *B. hyodysenteriae* су идентификоване путем PCR методе на начин како је описано од стране La i sar. (2006).

Макроскопска оцена фецеса

Макроскопска карактеризација и класификација фецеса обављана је свакодневно током трајања експеримента, односно од 0. до 21. дана. Одређивање категорије фецеса обављено је према класификацији коју су дефинисали Rubin и sar. (2013), табела 2.

Табела 2. Категорије фецеса (према Rubin и sar., 2013)

Ознаке категорија фецеса	Категорија фецеса
0	Формиран - нормалан
1	Мек (конзистенције влажног цемента)
2	Течан и/или воденаст
3	Слузав дијарејичан
4	Крвав дијарејичан

Производни параметри и њихова процена

Мерење телесне масе сваког прасета појединачно вршено је 0, 7, 14. и 21. дана експеримента. Из разлика телесних маса на почетку и крају експеримента израчунат је укупан прираст. Утрошак хране мерен је за сваку групу на крају сваке недеље (7, 14. и 21. дана експеримента) да би се добили подаци за сваки посматрани период, односно за прву, другу и трећу недељу експеримента засебно, као и за целокупан, тронедељни експериментални период. Из добијених података о утрошку хране и прирасту израчунаван је утрошак хране по килограму прираста – конверзија (енг. *Feed Conversion Ratio* - FCR) и то посебно за сваки посматрани период, односно за прву, другу и трећу недељу експеримента засебно, као и за целокупан, тронедељни експериментални период. Такође, током експерименталног периода три пута дневно је праћено здравствено стање прасади као и конзумирање хране и напајање водом.

Статистичка анализа

За процену разлика у учесталости категорија фецеса између група коришћен је χ^2 тест. Такође, χ^2 тест је коришћен за процену разлика учесталости категорија St вредности ($St \leq 40$ и $St > 40$) између група. С обзиром да су подаци за прираст за негативну контролу у другој и трећој недељи, као и у целокупном, тронедељном експерименталном периоду били хетерогени (коэффициент варијације већи од 30%), примењена је трансформација података $y=x+1$. Поређење просечних вредности прираста извршено је једнофакторском анализом варијансе за потпун случајан блок систем и Tukey тестом. За анализу утрошка и конверзије хране коришћени су релативни бројеви. Статистичка анализа резултата обављена је коришћењем софтвера STATISTICA v6.0 (StatSoft, Inc, Tulsa, USA) и GraphPad Prism верзија 6.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

5. РЕЗУЛТАТИ

5.1. УСПОСТАВЉАЊЕ ПРОТОКОЛА ЗА ИСПИТИВАЊЕ ЕФИКАСНОСТИ ФИТОГЕНИХ АДТИВА У КОНТРОЛИ ДИЗЕНТЕРИЈЕ СВИЊА КОД ОДЛУЧЕНЕ ПРАСАДИ ПРИРОДНО ИНФИЦИРАНЕ СА *B. hyodysenteriae*

У овом раду успостављен је протокол за утврђивање ефикасности два фитогена адитива (Patente Herba[®] и Patente Herba[®] Plus) у контроли дизентерије свиња применом молекуларно генетичких и микробиолошких метода идентификације *B. hyodysenteriae* и макроскопском оценом фецеса. Такав протокол показао се адекватним за добијање валидних резултата о ефикасности испитиваних адитива, а може се користити и за испитивање ефеката било којих других фитогених адитива на прасад старости седам недеља.

Успостављени протокол обухвата следеће кораке:

- Формирање експерименталних група. Групе се формирају тако што се изабере клинички здрава прасад старости седам недеља, коју треба обележити, измерити и распоредити у четири групе, а затим сместити у боксове који су физички одвојени. Број група зависи од броја препарата чији се ефекат испитује (у нашем случају две групе за два препарата), али је обавезна и једна група за третман конвенционалним леком који се уобичајено користи за решавање дизентерије свиња (као што је антибиотик тиамулином у нашем случају) и та група служи као позитивна контрола, као и једна група којој неће бити ништа додавано (која служи као негативна контрола). Приликом формирања група треба поштовати принцип да се из сваког легла по једно прасе распореди у сваку групу. На тај начин, свака група биће сачињена од прасади пореклом од различитих крмача.

- Узимање узорака фецеса за анализу присуства бактерије *B. hyodysenteriae* треба обавити од сваког појединачног прасета директно из ректума (индивидуални узорци), а за сваку групу прасади са пода сваког бокса (збирни узорци) следећом динамиком: на дан када се формирају групе (0. дан, односно дан пре почетка давања фитогених адитива), као и 7, 14. и 21. дана експеримента. Индивидуални узорци фецеса су потребни за молекуларно генетичку (PCR) идентификацију узročника, а збирни узорци фецеса за микробиолошку изолацију и идентификацију узročника.
- Примена фитогених адитива чији се ефекат испитује, као и третман конвенционалним леком (у групи која служи као позитивна контрола) по динамици и у дозама препорученим од стране произвођача, почев од 1. дана третмана (дан након 0. дана) у периоду од три недеље (21 дан).
- Лабораторијске анализе узорака фецеса ради утврђивања присуства, односно изолације и идентификације *B. hyodysenteriae*. Збирни узорци фецеса анализирају се путем микробиолошке методе коришћењем TSA(SVRC) подлоге, а индивидуални узорци путем молекуларно генетичке (PCR) методе (конвенционалним или *real-time* PCR поступком).
- Макроскопско оцењивање фецеса, које обухвата класификацију и карактеризацију фецеса, свакодневно током трајања експеримента (од 0. до 21. дана).
- Мерење производних параметара (количине утрошка хране по групи и телесне масе сваког прасета) на крају сваке недеље (7, 14. и 21. дана експеримента). Процена прираста и конверзије хране (на недељном и тронедељном нивоу).
- Статистичка обрада добијених резултата ради доношења закључка о успешности тестираних адитива у контроли дизентерије свиња и безбедности њихове примене.

5. 2. УТВРЂИВАЊЕ ЕФИКАСНОСТИ ДВА ФИТОГЕНА АДТИВА (РАТЕНТЕ HERVA[®] И РАТЕНТЕ HERVA[®] PLUS) У КОНТРОЛИ ДИЗЕНТЕРИЈЕ СВИЊА УТВРЂИВАЊЕМ ПРИСУСТВА УЗРОЧНИКА У ФЕЦЕСУ ПРИРОДНО ИНФИЦИРАНЕ ПРАСАДИ

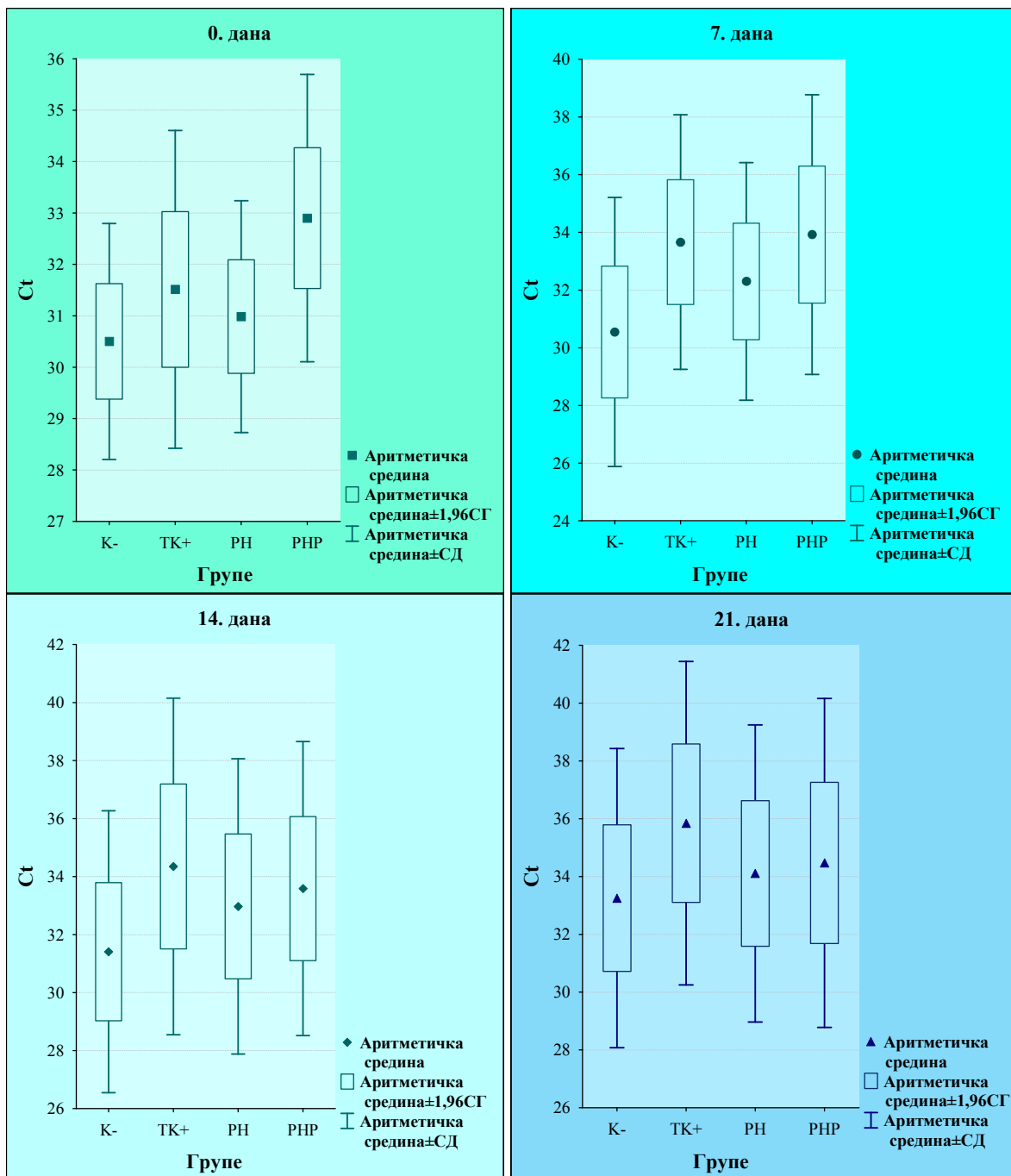
Анализа присуства *B. hyodysenteriae* у узорцима фецеса обављена је изолацијом узročника (микробиолошком методом) и идентификацијом путем молекуларно генетичких метода (конвенционални PCR и *real-time* PCR). Утврђивање присуства *B. hyodysenteriae* у фецесу не омогућава процену ефикасности адитива у контроли појаве наведеног обољења. Наиме, присуство *B. hyodysenteriae* је микробиолошки доказано у свим испитиваним узорцима. Такође, применом оба типа молекуларно генетичке анализе, ДНК бактерије *B. hyodysenteriae* утврђена је у свим узорцима. Осим наведених квалитативних резултата (добитених микробиолошким и конвенционалним PCR анализама), путем *real-time* PCR методе добитени су квантитативни подаци који указују на количину ДНК праћеног патогена у узорку, односно Ct вредности (Ct вредност је обрнуто пропорционална почетној количини циљне ДНК). Најмања просечна Ct вредност (односно највећа количина ДНК бактерије *B. hyodysenteriae*) у сва четири посматрана периода (првој, другој и трећој недељи експеримента и у целокупном, тронедељном експерименталном периоду) забележена је у К- групи. Највећа просечна Ct вредност (односно најмања количина ДНК бактерије *B. hyodysenteriae*) 0. и 7. дана је била у РНР групи, а 14. и 21. дана у ТК+ групи.

На основу коефицијента варијације у сва четири посматрана периода (односно у првој, другој и трећој недељи експеримента засебно, као и у целокупном, тронедељном експерименталном периоду) може се закључити да су све групе биле хомогене (табела 3 и графикон 1).

Резултати анализе варијансе указују да се просечне Ct вредности између група нису разликовале статистички значајно како 0. дана ($F=2,48$; $p=0,070$), тако ни 7. дана ($F=1,88$; $p=0,143$), 14. дана ($F=0,92$; $p=0,439$) и 21. дана ($F=0,64$; $p=0,593$). С обзиром да су за 14. и 21. дан вредности F статистике мање од 1, значи да су се подаци у групама више разликовали него између група, а и у самим групама варијабилитет није био испољен ($c_v \leq 30\%$). Резултати χ^2 теста указују да су у свим групама Ct вредности до 40 биле подједнако заступљене.

Табела 3. Основни статистички показатељи S_t вредности по посматраним периодима и групама

Посматрани период (дани)	Група	Аритметичка средина	Минимум	Максимум	Коефицијент варијације c_v (%)
Прва недеља (1-7)	К-	30,50	26,44	34,61	7,52
	ТК+	31,51	26,78	38,99	9,81
	РН	30,99	27,44	34,51	7,28
	РНР	32,90	28,98	38,11	8,49
Друга недеља (8-14)	К-	30,55	22,01	44,21	15,27
	ТК+	33,66	27,21	43,49	13,11
	РН	32,30	26,99	43,01	12,75
	РНР	33,93	28,54	44,34	14,29
Трећа недеља (15-21)	К-	31,41	25,22	42,22	15,47
	ТК+	34,35	28,12	44,66	16,89
	РН	32,97	28,09	44,06	15,45
	РНР	33,59	27,07	44,51	15,09
Целокупан, тронедељни експериментални период (1-21)	К-	33,25	25,55	43,76	15,56
	ТК+	35,85	27,85	42,91	15,61
	РН	34,11	27,96	43,84	15,07
	РНР	34,47	25,93	44,91	16,51

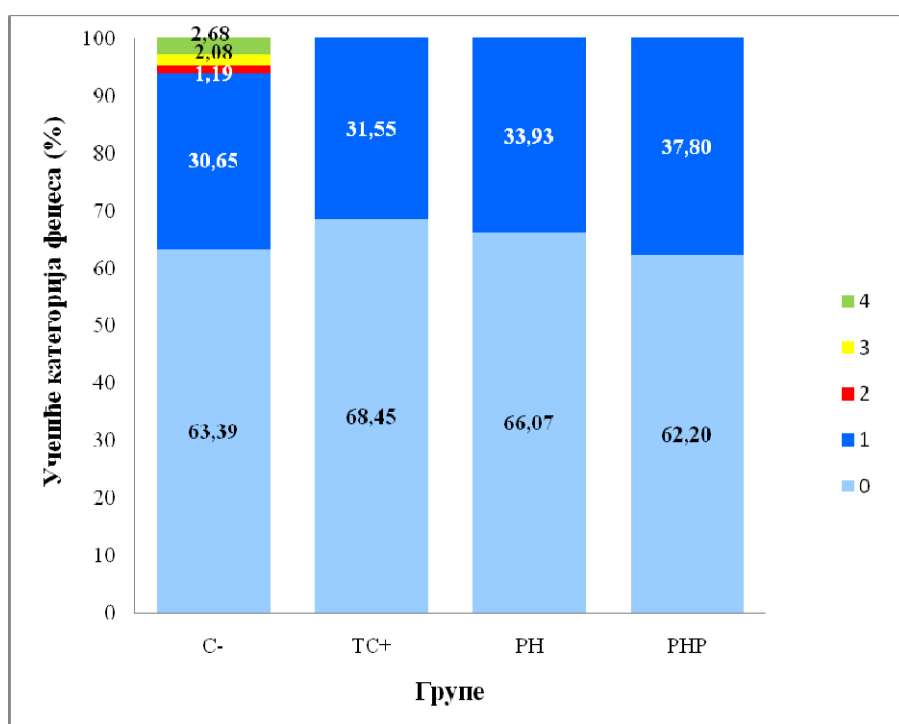


Графикон 1. Кретање Ct вредности по времену мерења и групама

5. 3. ДОБИЈАЊЕ РЕЗУЛТАТА КОЈИ ОМОГУЋАВАЈУ ДОНОШЕЊЕ ЗАКЉУЧКА О УСПЕШНОСТИ И БЕЗБЕДНОСТИ ТЕСТИРАНИХ АДТИВА У КОНТРОЛИ ДИЗЕНТЕРИЈЕ СВИЊА, КАО И ДАВАЊЕ ПРЕПОРУКЕ О НАЧИНУ ЊИХОВЕ ПРИМЕНЕ У ПРАКСИ.

5. 3. 1. Резултати макроскопске оцена фецеса

Током целокупног, тронедељног експерименталног периода (0-21. дан) код прасади из К- биле су заступљене све категорије фецеса, а код прасади из осталих посматраних група (ТК+, РН и РНР) јавио се само нормалан и мек фецес (графикон 2). χ^2 -тестом је утврђена статистички врло значајна разлика у учесталости категорија фецеса између негативне и позитивне контроле, односно између група К- и ТК+ ($\chi^2=20,70$; $p<0,001$), затим између група К- и РН ($\chi^2=20,74$; $p<0,001$), као и између група К- и РНР ($\chi^2=22,54$; $p<0,001$). Учесталост нормалног и меког фецеса није се статистички значајно разликовала између група ТК+ и РН ($\chi^2=0,33$; $p=0,565$), као ни између ТК+ и РНР ($\chi^2=2,63$; $p=0,105$). Такође није установљена статистички значајна разлика у структури категорија фецеса између група РН и РНР ($\chi^2=0,93$; $p=0,334$).



Графикон 2. Распоред категорија фецеса по групама

Напомена: 0 – формиран, нормалан фецес, 1 - мек фецес (конзистенције влажног цемента), 2 - течан и/или воденаст фецес, 3 - слузав дијарејичан фецес и 4 - крвав дијарејичан фецес.

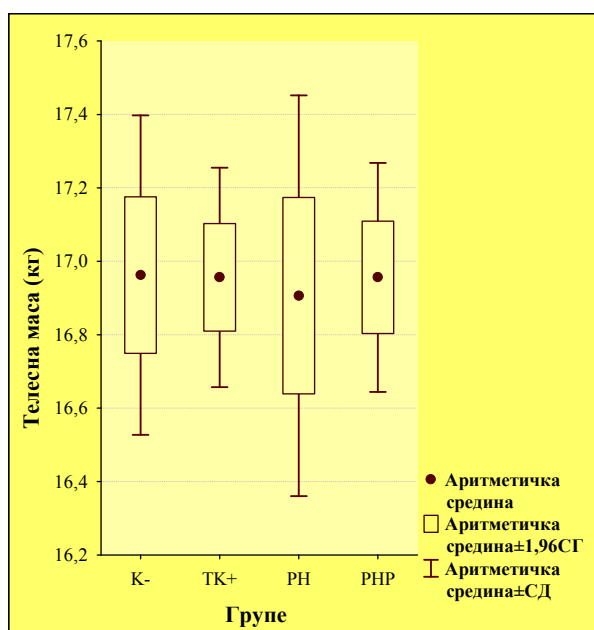
5. 3. 2. Производни резултати

5. 3. 2. 1. Телесна маса и прираст прасади

На почетку експеримента, телесна маса прасади кретала се од 15,60 кг до 17,60 кг и била је хомогена у групама, c_v од 1,76 до 3,23 % (табела 4). Анализом варијансе утврђено је да на почетку експеримента (0. дана) није било статистички значајне разлике у просечној телесној маси прасади између група ($F=0,068$; $p=0,376$), графикон 3. С обзиром да је $F<1$, телесна маса се мање разликовала код прасади између различитих група, него унутар група. Резултати анализе варијансе указују да су групе биле добро формиране за испитивање утицаја примењених препарата на просечну масу у току експеримента.

Табела 4. Основни статистички показатељи телесне масе прасади по групама 0. дана

Група	Аритметичка средина	Минимум	Максимум	Коефицијент варијације c_v (%)
К-	16,96	15,60	17,60	2,56
ТК+	16,96	16,10	17,40	1,76
РН	16,91	15,60	17,70	3,23
РНР	16,96	16,30	17,40	1,84



Графикон 3. Телесна маса прасади у експерименталним групама 0. дана

Најмањи просечан прираст у сва четири посматрана периода (односно у првој, другој и трећој недељи експеримента засебно, као и у целокупном, тронедељном експерименталном периоду) утврђен је у К-групи. Највећи просечан прираст у првој недељи је био у групама ТК+, РН и РНР (које су имале идентичан просечни прираст), у другој недељи у групама РН и РНР (које су имале идентичан просечни прираст), у трећој недељи у групама ТК+, РН и РНР (које су имале идентичан просечни прираст) и у целокупном, тронедељном експерименталном периоду у РН и РНР групама (које су имале идентичан просечни прираст).

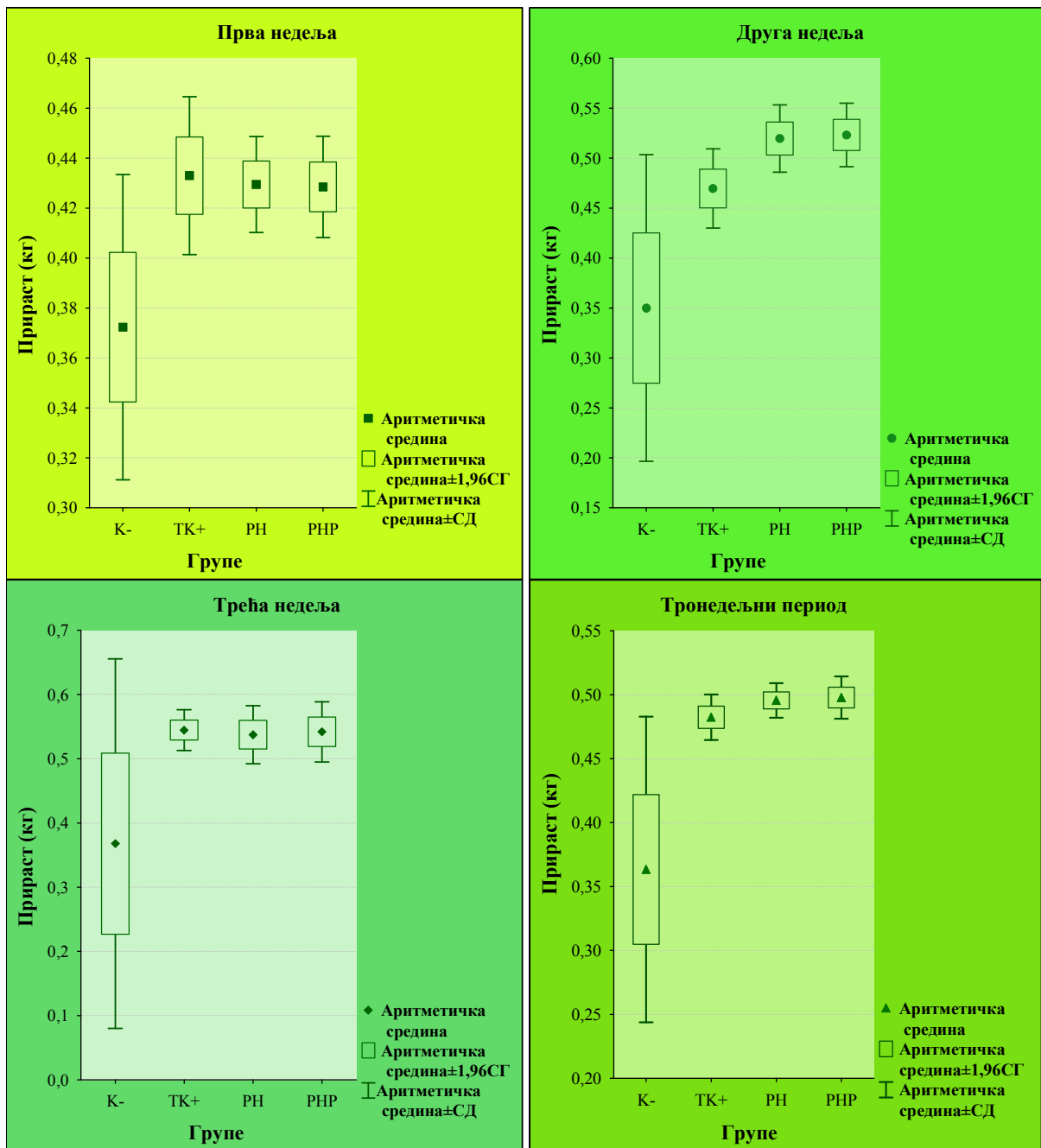
На основу коефицијента варијације у сва четири посматрана периода (у првој, другој и трећој недељи експеримента засебно, као и у целокупном, тронедељном експерименталном периоду), може се закључити да су групе ТК+, РН и РНР биле хомогене у просечном прирасту, за разлику од групе К- (табела 5).

Једнофакторска анализа варијансе је указала на статистички врло значајне разлике у просечном прирасту између група у сва четири посматрана периода и то: у првој недељи $F=10,983$; $p<0,001$; у другој недељи $F=14,868$; $p<0,001$; у трећој недељи $F=5,368$; $p=0,003$ и у целокупном, тронедељном експерименталном периоду $F=17,315$; $p<0,001$.

Tukey тест је показао да је прираст био статистички значајно ($p\leq 0.05$) нижи у групи К- него у осталим групама (ТК+, РН и РНР) у сва четири посматрана периода. Просечни прирасти група ТК+, РН и РНР нису се статистички значајно разликовали ни у једном посматраном периоду (графикон 4).

Табела 5. Основни статистички показатељи просечног прираста прасади по посматраним периодима и групама

Посматрани период (дани)	Група	Аритметичка средина	Минимум	Максимум	Коефицијент варијације c_v (%)
Прва недеља (1-7)	К-	0,37	0,26	0,46	16,41
	ТК+	0,43	0,37	0,49	7,31
	РН	0,43	0,40	0,46	4,47
	РНР	0,43	0,40	0,46	4,73
Друга недеља (8-14)	К-	0,35	0,04	0,51	43,86
	ТК+	0,47	0,37	0,56	8,45
	РН	0,52	0,47	0,59	6,50
	РНР	0,52	0,47	0,59	6,05
Трећа недеља (15-21)	К-	0,37	-0,34	0,63	78,21
	ТК+	0,54	0,49	0,59	5,82
	РН	0,54	0,46	0,63	8,40
	РНР	0,54	0,41	0,63	8,63
Целокупан, тронедељни експериментални период (1-21)	К-	0,36	0,10	0,51	32,90
	ТК+	0,48	0,44	0,51	3,68
	РН	0,50	0,47	0,52	2,73
	РНР	0,50	0,46	0,51	3,33



Графикон 4. Кретање прираста прасади по посматраним периодима и групама

5.3.2.2. Конверзија хране

Конверзија хране је у свим посматраним периодима била нижа у групама РН и РНР и ТК+ него у групи К-. У првој недељи је у ТК+, РН и РНР групама била 1,84; 1,80 и 1,81, респективно, односно била је за 6,60%, 8,63% и 8,12% нижа у односу на конверзију остварену у К- групи у којој је износила 1,97. У другој недељи је однос између утrophка хране и прираста у ТК+, РН и РНР групама био још повољнији, обзиром да је у њима конверзија износила 1,85; 1,82 и 1,82, респективно, а у односу на конверзију К- групе (у којој је била 2.07) била мања за 10,63%; 12,08% и 12,08%, респективно. У трећој недељи експеримента, у ТК+, РН и РНР групама конверзија је била 1,95, 1,97 и 1,96, респективно, док је у К- групи износила 2,38, тако да је у ТК+, РН и РНР групама по килограму прираста утrophак хране био за 18.06%, 17.23%, односно 17.65% мањи него у К-. Ако посматрамо конверзију у прве две недеље експеримента, резултати су били бољи у групама храњеним испитиваним препаратима (РН и РНР), него у позитивној контроли (ТК+) јер је конверзија у РН и РНР групама била за 2,16% нижа него у ТК+.

У целокупном, тронедељном експерименталном периоду, конверзија је била 1.89, 1.87, 1.87 и 2,13 у ТК+, РН, РНР и К- групама, респективно, односно за 11.27%, 12.21% и 12.21% је била мања у ТК+, РН и РНР групама у односу на К-.

Динамика конверзије хране

Повећање конверзије хране у другој недељи у односу на прву износило је 5,07% (К-), 0,88% (ТК+), 1,04% (РН) и 0,69% (РНР). Разлике између конверзије хране друге и треће недеље експеримента биле су: 14,91% (К-), 6,33% (ТК+), 9,39% (РН) и 8,51% (РНР), а прве и треће недеље: 20,74% (К-), 5,40% (ТК+), 8,26% (РН) и 7,77% (РНР).

Просечан утrophак хране по животињи

Најмањи утrophак хране био је у К- групи. Током прве недеље, у поређењу са К- групом, просечан утrophак хране у осталим групама био је већи и то: за 7,71% у групи ТК+, за 5,75% у групи РН и за 6,12% у групи РНР. Током друге недеље забележене су још израженије разлике, односно повећања утrophка хране у ТК+, РН и РНР групама у односу на негативну контролу (К-) и то за 21,25% када је у питању ТК+ група, за 30,34% у случају групе РН и за 30,83% када је реч о групи РНР. У трећој недељи је настављен тренд повећања утrophка хране у ТК+, РН и РНР групама у односу

на К- групу и то за 25,10% када је у питању ТК+ група, за 23,84% када је реч о групи РН и 25,00% у случају РНР групе. У целокупном, тронедељном експерименталном периоду, просечан утрошак хране у односу на К- групу био је већи за 18,39% у ТК+ групи, односно за 20,17% у групи РН и за за 20,87% у групи РНР.

Динамика утрошка хране

Просечан утрошак хране показује тенденцију раста, осим у К- групи где је у другој недељи мањи у односу на прву недељу за 0,37%, а затим већи у трећој већи за 16,95% у односу на другу и за 16,52% у односу на прву. У ТК+ групи утрошак хране је у другој недељи већи за 12,16%, а у трећој недељи у односу на другу за 20,67%. Пораст од прве до треће недеље износи 35,34%. Код група РН и РНР пораст за 22,80% тј. 22,83% у другој недељи према првој недељи прати пораст од 11,12% односно 11,74%. У трећој недељи утрошак хране у овим групама је за 36,46% тј. 37,25% већи у односу на прву недељу.

6. ДИСКУСИЈА

Дизентерија свиња представља значајан здравствени и економски проблем јер доводи до великих губитака услед морталитета прасади, њиховог слабог прираста, лоше конверзије хране, као и трошкова лечења. Побољшање биосигурносних мера, уз адекватну дезинфекцију и дератизацију чини основ превентиве овог обољења, али имплементација превентивних мера, нарочито на фармама слободним од *B. hyodysenteriae* захтева велика улагања, а самим тим и додатне трошкове (Hampson, 2012).

Познато је да је млада прасад веома пријемчива на различите стресоре, укључујући бактеријске патогене, оксидативни стрес и упале, што последично доводи до смањења прираста, високе стопе морталитета и морбидитета, односно угрожавања њихове добробити. Због тога је постојао тренд у читавом свету да се у исхрани свиња, нарочито у најмлађем периоду, користе антибиотски промотери раста. Ова пракса је била примењивана у великој мери, јер се сматрало да се на тај начин постиже контрола појаве дијареје (која се јавља након одлучења) и побољшање прираста. Употреба антибиотских промотера раста у храни за конзумне животиње забрањена је у земљама ЕУ од 2006. године (Bengtsson и Wierup, 2006). У САД је тек недавно, односно 2016. године америчка агенција за храну и лекове (*U.S. Food and Drug Administration - FDA*) ограничила употребу антибиотика у исхрани животиња, а у Канади је организација *Health Canada* забранила њихову употребу 2017. године (Omonijo и сар., 2017). Међутим, потрошња антимикуробних средстава у храни за конзумне животиње широм света и даље показује растући тренд; у 2010. години укупна потрошња антибиотика у исхрани фармских животиња достигла је ниво од 63,151 тоне на светском нивоу. Када су у питању свиње, годишња потрошња антимикуробних средстава по килограму телесне масе процењена на 148 mg/kg (Van Voeckel и сар., 2015). Последица овакве праксе је ширење

бактеријских патогена резистентних на антибиотике како међу свињама, тако и на људе, што представља значајну претњу по јавно здравље (Yang и сар., 2015). Светска здравствена организација (*World Health Organization* – WHO) је последично стање изазвано резистенцијом микроорганизама означила као глобалну здравствену кризу због потврђене везе између распрострањене употребе антимикробних средстава у производњи конзумних животиња и развоја антимикробне резистенције код бактеријских популација (WHO, 2012). Иако заговорници примене антибиотика у исхрани пропагирају став да већина антибиотика који се користе у сточарству није „медицински значајна“, чињенице показују да је само у 2014. години од укупне количине антибиотика продате за употребу у сточарству, 9.5 милиона килограма било идентично или веома слично антибиотицима који се користе у лечењу људи (FDA, 2015). Међутим, прекид употребе антибиотика у храни за конзумне животиње прати већи број проблема (повећани морталитет, продужени период производње услед смањеног прираста), нарочито у периоду непосредно након престанка примене антибиотика у сточној храни. Осим тога, проблем је и повећане потрошње антибиотика у терапијске сврхе (Cogliani и сар., 2011; Maletić и сар., 2015). У Шведској и Данској, које су међу првима усвојиле систем контроле примене примене антибиотика у сточарству, произвођачи меса (свињског, живинског, говеђег) данас немају проблема ни у погледу очувања здравственог стања животиња, нити са економске тачке гледишта. Међутим, у знатно већем делу света, такви проблеми су веома чести и трају све док се не успостави систем ефикасне, а економски исплативе производње коришћењем алтернатива за антибиотике (Magon и сар., 2013). Због тога је од пресудног значаја развој економичне алтернативе антибиотицима ради постизања дугорочне одрживости у производњи свиња (Yang et al., 2015; Valenzuela-Grijalva и сар., 2017). Као алтернативе антибиотицима коришћеним у храни као стимулаторима раста ефикасно су се показале органске киселине (Eckel и сар., 1992; Mroz, 2005; De Lange и сар., 2010; Upadhaya и сар., 2014), ензими (Bedford и Cowieson, 2012; Kiarie и сар., 2013), пробиотици (Heo et al., 2013; Musa и сар., 2009), антимикробни пептиди (Choi и сар., 2013), средње-ланчане масне киселине (Boyen и сар., 2008; Liu, 2015) и етарска уља (Windisch и сар., 2008; Gong и сар., 2013; Omonijo и сар., 2017; Petrujkic и сар., 2018; Drašković и

сар., 2018). Танини такође имају потенцијал као алтернатива антибиотицима који се додају у храну фармским животињама. Након бројних доказа о њиховом позитивном ефекту код преживара (што је описано ревијалном раду Huang и сар. (2017), новији налази указују да и код свиња (као моногастричних животиња) танини имају позитиван ефекат по микробиом цревног тракта, побољшавају варење, опште здравствено стање и прираст (Viagia и сар., 2010; Parys и сар., 2010; Yan и Kim, 2011; Brus и сар., 2013), али само у тачно одређеним, ниским концентрацијама.

Фитогени адитиви или фитобиотици су састојци биљака која имају позитиван утицај на здравље животиња и сточарску производњу. Као фитобиотици користе се целе биљке или делови биљака (на пример у случају зачина) и различити биљни деривати (биљни екстракти, етарска уља, уљане смоле) и њихове мешавине. Фитогени адитиви у храни за конзумне животиње користе се у циљу побољшања њихових производних резултата, јер делују на здравствено стање и раст животиња, па самим тим и на квалитет намирница анималног порекла (Windisch и сар., 2008; Gregačević и сар., 2014).

Постоји више начина којим фитогени адитиви остварују позитиван утицај на животиње, а најчешће:

- повећањем апетита и конзумирања хране (јер побољшавају укус) и побољшањем варења (због позитивног утицаја на микробиом црева), што резултира повећањем прираста животиња;
- антимикробним деловањем (инхибирањем раста микроорганизама);
- антиинфламаторним деловањем, захваљујући свом супресивном утицају на метаболизам упалних простогланина;
- антиоксидативним деловањем, због способности неутрализације слободних радикала или активације антиоксидативних ензима;
- имуностимулативним деловањем, услед стимулације активности лимфоцита, макрофага и *natural-killer* ћелија, као и фагоцитозе и синтезе антиинфламаторних цитокина;
- антипаразитски, захваљујући променама у ултраструктури ћелија паразита, односно деструктивном деловању на ћелијску, једарну или митохондријалну мембрану паразита; инхибирањем активности

протеаза, инхибицијом биосинтезе протеина, или тако што повећавају производњу NO макрофага, стимулишу активност лизосома и фагоцитозу макрофага домаћина;

(Frankić i sar., 2009; Monzote и сар., 2012; Kumar i sar., 2014; Yang et al., 2015; Stanimirović и сар., 2017; Valenzuela-Grijalva и сар., 2017)

Од свих фитогених адитива, највише су испитивана етарска уља. Етарска уља су природна биоактивна једињења пореклом од биљака која имају позитивно дејство на здравље и раст животиња. Делотворност етарских уља или њихове мешавине са другим природним супстанцама (органским киселинама, флавоноидима и сл.), доказана је код свиња у контроли цревних бактеријских инфекција, односно очувању цревне микробиоте и дигестивне функције и превенцији дијареје, али и у јачању имуног одговора и општег здравственог стања, у бољем искоришћавању хране и повећању прираста (Manzanilla et al., 2004; Namkung et al., 2004; Kroismayr и сар., 2008; Li et al., 2012; Zeng и сар., 2015; Omonijo и сар., 2017; Petrujkić и сар., 2018; Drašković и сар., 2018).

Етарска уља су ароматичне, испарљиве течности уљане конзистенције, екстраховане из целих биљака, или само из одређених биљних делова, као што су семена, цветови, листови, пупољци, гранчице, коре, стабла, плодова и коренова. Имају велики спектар активности од којих су најзначајнија антимикробно, антиинфламаторно и антиоксидативно дејство (Vondruskova и сар., 2010; Hashemi и Davoodi, 2011), због чега се сматрају најбољом алтернативом антибиотцима у превенцији дијареје код одлучене прасиди (Vondruskova и сар., 2010). Такође, метанолни екстракти биљке *Nepeta rtanjensis* имају антиоксидативно и антигенотоксично дејство, што даје основу за њихово коришћење у медицини и ветерини (Bošnjak-Neumüller и сар., 2017).

У производњи свиња, оригано, цимет, мексички бибер, мајкина душица и *Camellia sinensis* могу се користити за смањење масе патогених микроба у цревима (Manzanilla и сар., 2004; Namkung и сар., 2004; Zanchi и сар., 2008). Сангровит и екстракт од старог белог лука са активном компонентом алицином доприносе повећању тежине свиња (Tatara и сар., 2008), док мајкина душица, каранфилић, оригано, еугенол и карвакрол делују

стимулативно на производне параметре свиња (Oetting и сар., 2006; Costa и сар., 2007), што није постигнуто покушајима примене конјуговане линолне киселине (Stanimirović и сар., 2012). Комбинација тимола и цинамалдехида побољшава прираст и смањује дијареју вероватно услед побољшања имуног статуса, супресије развоја патогених микроорганизама у цревима и повећања сварљивости хранљивих састојака (Li и сар., 2012).

Када је реч о дизентерији свиња, постоји велика потреба за тестирањем ефикасности фитогених адитива у контроли овог обољења због великог броја извештаја о смањеној осетљивости *B. hyodysenteriae* на антибиотике који се најчешће користе у превенцији и лечењу дизентерије свиња. Наиме, у терапији дизентерије свиња користе се антибиотици из групе плеуромутилина (тиамулин и валнемулин), макролида (тилозин и тилвалозин) и линкозамида (линкомицин). Најефикаснијим се сматрају антибиотици из групе плеуромутилина, али је одавно позната смањена осетљивост *B. hyodysenteriae* на њих (Lobova и сар., 2004; Karlsson и сар., 2004; Pringle и сар., 2004; Prasek и сар., 2014; Rugna и сар., 2015). Резистенција *B. hyodysenteriae* на макролиде и линкозамиде је још чешћа. На основу података са целе територије Европске уније утврђено је да је скоро 100% изолата *B. hyodysenteriae* резистентно на тилозин и линкомицин (Karlsson и сар., 1999; 2004; Hidalgo и сар., 2011; Pyörälä и сар., 2014). На исте антибиотике је у САД недавно утврђена слаба осетљивост четири *Brachyspira* врсте (Mirajkar et al. 2016). Узрок појаве резистенције су најчешће тачкасте (*point*) мутације у домену V гена за 23S rRNA и гена за рибозомални протеин L3 (Karlsson и сар., 1999; Pringle и сар., 2004; Hidalgo и сар., 2011). Током последње деценије све чешће се бележе мултирезистентни сојеви *B. hyodysenteriae* (Duihof и сар., 2008; Ohya и Sueyoshi, 2010; Hidalgo и сар., 2011; Šperling и сар., 2011). Значајно је навести да је код бактерија рода *Brachyspira*, у поређењу са свим осталим патогенима, забележено најдраматичније повећање резистенције (Pyörälä и сар., 2014). Поред тога, неефикасност лекова у лечењу дизентерије свиња код ендемски инфицираних запата или у спречавању избијања болести код запата без дизентерије, као и смањења осетљивости изолата *B. hyodysenteriae*, представљају додатни ризик за појаву резистентних сојева *B. hyodysenteriae*

отпорних на неке или чак све антибиотике који се обично користе за лечење дизентерије свиња, а ти сојеви се затим могу ширити на фарми или на друге фарме преко уобичајених извора инфекције (Šperling и сар., 2011; Prášek и сар., 2014; Savić и сар., 2017). Поврх свега, осим резистенције, антибиотици који се користе за лечење свиња, имају и друге негативне ефекте. Тако је за карбадокс и олаквидокс, као и за деривате олаквидокса доказано да имају генотоксични и цитотоксични ефекат (Marković и сар., 2000a,b; Chen и сар., 2009), а за тиамулин и ипронидазол, мада само ако се примене у већим дозама, доказани су мутагени и канцерогени ефекат (Marković и сар., 2002a,b, 2004). Значајно је поменути и да је од 2006. године, након што је у земљама ЕУ ступила на снагу забрана употребе антибиотика као промотора раста, забележено повећање потрошње антибиотика у терапијске сврхе, укључујући и оне који се користе у контроли инфекције изазване са *B. hyodysenteriae* (Cogliani и сар., 2011). Због свега наведеног, алтернативне мере за контролу дизентерије свиња су више него добродошле.

Биљни препарати, укључујући фитогене адитиве, код животиња се примењују углавном због њиховог антимикуробног дејства. Потенцијал фитогених адитива у превенцији и контроли цревних болести код свиња вреди проучавати због њиховог благотворног утицаја на цревни микробиом, дигестивне функције и напредовање одлучене прасади (Namkung и сар., 2004; Papatsiros и сар., 2009; Li и сар., 2012; Zeng и сар., 2015). Фитогени адитиви не изазивају резистенцију код бактерија нити штетне ефекте по здравље животиња и конзумената меса третираних животиња (Papatsiros и сар., 2011; Yang и сар., 2015). Осим тога, Агенција за безбедност хране и лекова (FDA, 2013) је производе на бази биљака (укључујући фитогене адитиве) класификовала као безбедне (*Generally Recognized As Safe* - GRAS) те се они сматрају добром алтернативом у контроли и/или лечењу бактеријских дијареја код животиња (Papatsiros и сар., 2009).

Међутим, на основу нама доступне литературе, обављено је само неколико испитивања ефикасности биљних састојака против узрочника дизентерије свиња, *B. hyodysenteriae*. Након једног пилот огледа чији су резултати објављени у виду саопштења (Jakab и сар., 2011), обављена су и три истраживања чији су резултати објављени у научној литератури (Vande Maele и

cap., 2016; Kutasi и cap., 2016; de Nova и cap., 2017). Заједничко за сва четири наведена испитивања је да је антибактеријски потенцијал тестираних биљних супстанци против *B. hyodysenteriae* процењиван *in vitro*, односно одређивањем минималне инхибиторне концентрације (*minimum inhibitory concentrations* - MIC).

У првом истраживању анализиране су различите концентрације (разблажења) екстракта мајкине душице (*Thymus vulgaris*) и семена рогача (*Ceratonia siliqua*) и њихове комбинације. Антимикробни ефекат на *B. hyodysenteriae* одређиван је на основу MIC вредности. На основу резултата, утврђено је које су најефикасније концентрације екстраката обе биљке, те је од њих направљена најбоља комбинација екстраката, односно произведен фитогени адитив који је потом коришћен за пилот истраживање *in vivo*. Прасад је храњена тим адитивом на пет фарми (једном малој, једној средњој и три велике) које су дуже време имале високу преваленцу дизентерије свиња. Ефекат фитогеног адитива процењиван је на основу трошкова лечења. Додатно је анализиран и утицај тестираног адитива на производне параметре, дневни прираст и конверзију хране. Утврђено је да је адитив даван прасадима ефикасно смањио трошкове лечења на пет фарми које су имале вишегодишњи проблем са дизентеријом свиња. Када је реч о производним резултатима, утврђено је да је додавање тестираног адитива код прасади побољшало прираст и конверзију (Jakab и cap., 2011).

У другом истраживању је процењивано дејство мешавине етарских уља и органских киселина (укупно 15 супстанци) следећег састава: цинамалдехид, тимол, еугенол и карвакрол и 11 органских киселина (мравља, лимунска, бензоева, млечна, сирћетна, пропионска, бутиринска, капроинска, каприлинска, капринска, лауринска). Највећи антибактеријски потенцијал према *B. hyodysenteriae* показали су цинамалдехид и лауринска киселина примењене појединачно. Испитано је и седам комбинација двеју супстанци: цинамалдехид и бутиринска киселина, цинамалдехид и лауринска киселина, капринска киселина и тимол, тимол и карвакрол, бутиринска киселина и лауринска киселина, лауринска киселина и карвакрол, цинамалдехид и карвакрол. Већина је испољила адитивни ефекат, док је комбинација тимола и карвакрола испољила синергистички ефекат (Vande Maele и cap., 2016).

У трећем раду, такође *in vitro*, доказана је бактерицидна ефикасност воденог екстракта култивисане мајкине душице (*Thymus vulgaris*) према *B. hyodysenteriae*. Иако је испитивани екстракт показао инхибиторно дејство према свих шест сојева *B. hyodysenteriae*, закључено је да је неопходно је проверити валидност тог налаза и закључка спровођењем *in vivo* експеримената (Kutasi и сар., 2016).

У четвртом истраживању, такође спроведеном *in vitro*, испитивана је антимикробна активност екстракта цитрусног воћа (BIOCITRO) који је комерцијализован у сировом облику и користи се као адитив у храни за свиње са циљем сузбијања *B. hyodysenteriae*. Осим минималне инхибиторне и минималне бактерицидне концентрације (MIC и MBC) екстракта BIOCITRO одређивање за десет изолата *B. hyodysenteriae*, културе два соја *B. hyodysenteriae* су биле подвргнуте током 90 минута дејству четири различите концентрације екстракта BIOCITRO и поређене са нетретираном контролом путем проточне цитометрије (FC), Fourier-ове трансформационе инфрацрвене спектроскопије (FTIR) и скенинг електронске микроскопије (SEM). Резултати су показали да екстракт BIOCITRO има значајно бактериостатично и бактерицидно дејство против *B. hyodysenteriae*. Испитивани екстракт изазива оштећења најмање 35% и 76% бактеријских ћелија када су изложене дејству BIOCITRO екстракта јачине 128 ppm, односно 256 ppm што је утврђено на основу уноса пропидијум јодида путем проточне цитометрије. Значајне промене у структури бактеријских ћелија уочене су коришћењем SEM методе и потврђене коришћењем FTIR. На основу ових резултата закључено је да BIOCITRO представља задовољавајућу алтернативу антибиотицима у контроли дизентерије свиња (de Nova и сар., 2017). У сва четири наведена рада (Jakab и сар., 2011; Vande Maele и сар., 2016; (Kutasi и сар., 2016; de Nova и сар., 2017) испитивање ефикасности препарата према *B. hyodysenteriae* обављано је диск дифузионом методом на агару, за коју је познато да је корисна за квалитативну процену биолошке активности етарских уља, али није одговарајућа за процену квантитативних ефеката (Donaldson и сар., 2005). Међутим, до нашег истраживања, дејство биљних препарата на *B. hyodysenteriae in vivo* било је непознато. Стога је ово наше истраживање прво клиничко испитивање ефикасности фитогених адитива у превенцији и контроли дизентерије свиња,

обзиром да је експеримент обављен на прасадима природно инфицираним бактеријом *B. hyodysenteriae*.

У нашем раду тестирана су два фитогена адитива, Patente-Herba® и Patente-Herba® Plus, и резултати су указали да су оба испољила ефикасност у превенцији и контроли избијања дизентерије свиња. Узрочник дизентерије, *B. hyodysenteriae*, потврђен је у свим узорцима применом микробиолошке и PCR методе, а ефикасност је утврђена на основу резултата макроскопске оцене фецеса. Наиме, у групама које су добијале Patente-Herba® или Patente-Herba® Plus забележен је само нормалан или мек фецес, док су у нетретираној групи (негативној контроли) забележене све остале категорије фецеса (течан и/или воденаст, слузав дијарејичан и крвав дијарејичан). Треба нагласити да је између група које су добијале фитогене адитиве и негативне контроле χ^2 тестом утврђена статистички значајна разлика ($p < 0,001$) у учесталости категорија фецеса. Разлике истог нивоа статистичке значајности ($p < 0,001$) потврђене су и између негативне и позитивне контроле (која је добијала тиамулин). Важно је нагласити да између група које су добијале Patente-Herba® или Patente-Herba® Plus нису утврђене статистички значајне разлике ($p = 0,334$) у структури категорија фецеса што указује на компарабилну ефикасност тестираних препарата у контроли дизентерије свиња. Значајно је истаћи и да између позитивне контроле и група које су добијале тестиране адитиве Patente-Herba® или Patente-Herba® Plus није установљена статистички значајна разлика у структури категорија фецеса ($p = 0,565$; $p = 0,105$, респективно), што указује на закључак да је ефикасност оба тестирана адитива у контроли дизентерије свиња компарабилна са ефикасношћу антибиотика тиамулина (Delić и сар., 2018). Ипак, при избору препарата, предност имају фитогени адитиви због познатих, раније описаних проблема који прати употреба тиамулина (Lobova и сар., 2004; Karlsson и сар., 2004; Pringle и сар., 2004; Prasek и сар., 2014; Rugna и сар., 2015).

На позитиван ефекат оба адитива анализирана у нашем раду такође су указали и резултати прираста, обзиром да су утврђене статистички значајне разлике између група варијације у сва четири посматрана периода (у првој, другој и трећој недељи експеримента засебно, као и у целокупном,

тронедељном експерименталном периоду), при чему је прираст био статистички значајно нижи ($P \leq 0,05$) у негативној контроли у поређењу са групама третираним са фитогеним адитивима било Patente-Herba® или Patente-Herba® Plus. Није било статистички значајних разлика између прираста постигнутих у групама које су добијале тестиране адитиве, као ни између прираста у групама које су добијале адитиве и прираста у позитивној контроли, те можемо закључити да адитиви међусобно имају компарабилно дејство на прираст, али и да је њихово дејство компарабилно са тиамулином (Delić и сар., 2018). Ипак, због могућих негативних ефеката при примени тиамулина (Lobova и сар., 2004; Karlsson и сар., 2004; Pringle и сар., 2004; Prasek и сар., 2014; Rugna и сар., 2015), предност треба дати препаратима на бази природних једињења.

У сва четири посматрана периода (у првој, другој и трећој недељи експеримента засебно, као и у целокупном, тронедељном експерименталном периоду), утврђено је да су групе које су добијале фитогене адитиве имале већи унос хране и мању конверзију у односу на контролну групу. Већи унос хране са додатком фитогених адитива може се повезати са стимулативним ефектима које етарска уља имају на апетит јер побољшавају укус и мирис хране (Jasela и сар., 2010). Конверзија хране код прасади које су добијале фитогене адитиве била је мања у односу на прасад из негативне контроле, али није се разликовала од конверзије код прасади које су добијале тиамулин (Delić и сар., 2018).

Сви добијени резултати указују да су оба тестирана адитива имала ефикасност компарабилну тиамулину, како у превенцији и контроли избијања дизентерије свиња, тако и у утицају на прираст, унос хране и конверзију (Delić и сар., 2018). Такође, ни један од тестираних адитива није показао предност над другим. Ипак, ако је потребно одабрати један од два тестирана адитива, предност има Patente-Herba® Plus јер је економичнији. Наиме, Patente-Herba® Plus примењен у количини 1 kg/t остварио је компарабилан ефекат у контроли дизентерије свиња и у утицају на прираст као и Patente-Herba® примењен у количини 2 kg/t (Delić и сар., 2018). Ове чињенице су значајне јер је развој економичне алтернативе антибиотицима пресудног значаја за постизања

дугорочне одрживости у производњи свиња (Yang et al., 2015; Valenzuela-Grijalva и сар., 2017).

Ефикасност тимола и карвакрола против *B. hyodysenteriae*, као и њихов синергистички ефекат потврђени су *in vitro* (Vande Maele и сар., 2016). Пошто су оба етерична уља присутна у адитивима тестираним у нашем раду, могли бисмо спекулисати да је *in vivo* антимикуробна активност ових етеричних уља сигурно делимично одговорна за ефикасност Patente-Herba® и Patente-Herba® Plus у контроли дизентерије свиња. Препарат Patente-Herba® Plus је у недавном истраживању које су спровели Drašković и сар. (2018) показао ефикасност и у контроли пролиферативне ентеропатије (узроковане бактеријом *Lawsonia intracellularis*).

Коначно, на основу увида у нама доступну литературу, ово је прво *in vivo* проучавање у коме је процењена ефикасност фитогених адитива у контроли дизентерије свиња. Тестирани адитиви Patente-Herba® и Patente-Herba® Plus су се показали ефикасним у лечењу ове опаке болести свиња узроковане бактеријом *B. hyodysenteriae*. Иако су ефекти фитогених адитива били упоредиви с онима које испољава тиамулин, употребу биљних производа треба стимулисати како би се смањио ризик настанка резистентних сојева *B. hyodysenteriae* и избегли проблеми повезани са употребом антибиотика.

Када је реч о методологији везаној за лабораторијско доказивање бактерије *B. hyodysenteriae*, треба нагласити да методе детекције, идентификације и карактеризације *Brachyspira* пореклом из клинички оболелих животиња нису стандардизовани, те различите лабораторије често развијају сопствене протоколе. Ово се нарочито односи на методе којима се испитује осетљивост узрочника на антимикуробне супстанце. У литератури је описано постојање методолошких ограничења и недоследности у постојећим поступцима испитивања осетљивости, те су потребна извесна побољшања и стандардизација дијагностичких поступака. Бактерије рода *Brachyspira* захтевају посебне услове раста, обично не формирају колоније на агару, њихов раст у бујону је непредвидљив, а за разлику од других бактерија, нпр. *E. coli*, немају одређене фенотипске карактеристике, што све отежава њихову идентификацију (Kulathunga и сар., 2017). Због тога за *Brachyspira* spp. још

увек није објављен стандардизовани протокол култивисања, док за разне друге анаеробне и захтевне микроорганизме, као што су они из групе НАСЕК (*Haemophilus* spp., *Aggregatibacter* spp., *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* и *Kingella* spp.), затим *Helicobacter*, *Listeria*, *Moraxella*, *Campylobacter*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, методе култивисања развијене (CLSI 2015, 2016, 2017).

Молекуларне методе показале су се изузетно корисним у дијагностици, али се мора водити рачуна при тумачењу резултата, имајући у виду ограничења теста због осетљивости и специфичности прајмера. У идентификацији брахиспира MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time of Flight*) масена спектрометрија показала је резултате који обећавају (Calderaro и сар., 2013; Prohaska и сар., 2014; Warneke и сар., 2014). Филогенетска анализа, нарочито гена NADH оксидазе (*nox*), дала је упоредиве податке који могу да се користе у различитим лабораторијама (Savić и сар., 2017). За сада се анализа секвенци ДНК сматра златним стандардом за идентификацију на нивоу врсте (Perez и сар., 2016; Rohde и сар., 2014).

PCR се показала као метода чија је специфичност и сензитивност у детекцији брахиспира већа у односу на друге методе (La и сар., 2003; Willems и Reiner, 2010), мада постоји и податак да је мање осетљива од методе доказивања у култури (Råsbäck и сар., 2006). У недавном раду Hartnack и сар. (2014) су поредили тачност PCR и класичног културелног теста за детекцију и идентификацију брахиспира и утврдили да је осетљивост културелног испитивања 88,6%, а PCR методе 73,2%. Међутим, у истом раду утврђено је да PCR одликује виша специфичност 96,2% у односу на културелни метод (94.6%). Стога, за идентификацију бактерије *B. hyodysenteriae* не постоји „златни стандард“ као што је то за бактерију *Lawsonia intracellularis* где се „златним стандардом“ сматрају PCR метода и имунохистохемија-ИНС (Jordan и сар., 1999; Kroll и сар., 2005). Разлог зашто нема „златног стандарда“ је што ниједна од до сада описаних метода није сасвим без грешке, односно нема 100% осетљивост и специфичност.

Један од разлога непрецизности PCR методе у дијагностици бактерије *B. hyodysenteriae* лежи у томе што свињски фецес садржи велику количину инхибитора (Råsbäck и сар., 2006). Наиме, PCR је осетљива и специфична

метода, али инхибиторни фактори у фецесу могу проузроковати лажно негативне резултате (Jacobson и сар., 2003). Лажно негативни резултати могу да утичу на лакше ширење инфекције међу животињама, док лажно позитивни могу да доведу до непотребног жртвовања животиња које нису инфициране. За ефикасну превенцију и контролу инфекције неопходне су информације о особинама тестова који се примењују у дијагностици. Посебан проблем постоји у процени квалитета нових тестова за детекцију брахиспира јер нема златног стандарда међу постојећим тестовима, те постоји извесна несигурност у вези са резултатима који су добијени применом постојећих тестова.

Одсуство консензуса о начину идентификације и изолације брахиспира до нивоа врсте највећи је камен спотицања у унапређењу лабораторијске дијагностике. За сада не постоји препоручена метода, односно поступак за дијагностику, односно потврду присуства *B. hyodysenteriae* у узорку (Kulathunga и сар., 2017).

Методолошка ограничења и недоследност у постојећим поступцима испитивања осетљивости, разлог су због кога се тренутним дијагностичким методама не може поуздано испитати ефекат медикаментозних средстава у терапији дизентерије свиња. Наши резултати анализе варијансе о одсуству статистички значајних разлика просечне Ct вредности између група како 0. дана ($p=0,070$), тако и 7. дана ($p=0,143$), 14. дана ($p=0,439$) и 21. дана ($p=0,593$), и налаза $F<1$ за 14. и 21. дан, указали су да *real-time* PCR није адекватан за квантитативну процену ефикасност препарата у контроли дизентерије свиња, што значи да се на основу добијених Ct вредности не може валидно проценити количина ДНК *B. hyodysenteriae* у узорку, те самим тим да *real-time* PCR није адекватна метода за процену ефикасност препарата на бактерију *B. hyodysenteriae*.

7. ЗАКЉУЧЦИ

- Успостављени протокол за утврђивање ефикасности фитогених адитива у контроли дизентерије свиња показао се адекватним за добијање валидних резултата како у случају испитиваних фитогених адитива Patente-Herba® и Patente-Herba® Plus, тако и за испитивање ефеката других фитогених препарата на прасад старости седам недеља.
- Оба испитивана фитогена адитива Patente-Herba® и Patente-Herba® Plus су испољила ефикасност у превенцији и контроли настанка клинички манифестне дизентерије свиња, обзиром да су утврђене статистички врло значајне разлике ($p < 0,001$) у учесталости категорија фецеса између група које су добијале тестиране адитиве и негативне контроле.
- Patente-Herba® и Patente-Herba® Plus показала су сличну ефикасност у контроли дизентерије свиња јер нису утврђене статистички значајне разлике у структури категорија фецеса ($p = 0,334$) између група које су добијале испитиване адитиве.
- Оба испитивана фитогена адитива показала су сличну ефикасност у превенцији настанка и контроли дизентерије свиња као и лекови на бази тиамулин хидроген фумарата обзиром да између група које су добијале Patente-Herba® или Patente-Herba® Plus и групе која је добијала лек тиамулин није било статистички значајних разлика ($p = 0,565$, односно $p = 0,105$) у учесталости нормалног и меког фецеса.
- Добијени резултати указују да оба испитивана адитива имају сличну ефикасност, како међусобно, тако и у односу на тиамулин у превенцији

настанка и контроли дизентерије свиња и у утицају на прираст, утрошак и конверзију хране, због чега би, предност у контроли овог обољења требало дати препаратима на бази природних једињења, као што су Patente-Herba® или Patente-Herba® Plus.

- Фитогени адитив Patente-Herba® Plus је економичнији у поређењу са Patente-Herba® јер се његовом применом у количини од 1 kg/t хране остварује компарабилан ефекат у контроли дизентерије и утицају на прираст, као и при употреби препарата Patente-Herba®, али у дупло већој количини од 2 kg/t хране.
- Резултати конвенционалне PCR и *real-time* PCR анализе су показали да су обе методе валидне за детекцију и идентификацију *B. hyodysenteriae*.
- На основу просечних Ct вредности уочено је да су у свим посматраним периодима највеће количине ДНК бактерије *B. hyodysenteriae* биле у негативној контроли, а најмање количине у групама третираним препаратом Patente-Herba® Plus 0. и 7. дана, односно групи третираној тиамулином 14. и 21. дана.
- *Real-time* PCR се може користити за квантификацију ДНК бактерије *B. hyodysenteriae*, међутим, за процену ефикасности препарата у контроли дизентерије свиња у односу на квантификацију укупног броја *B. hyodysenteriae* неопходна је оптимизација методе.

8. ЛИТЕРАТУРА

1. Aeschbach R, Löliger J, Scott BC, Murcia A, Butler J, Halliwell B, Aruoma OI (1994) Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food Chem Toxicol* 32: 31-36.
2. Argenzio RA, Whipp SC, Glock RD (1980) Pathophysiology of swine dysentery: colonic transport and permeability studies. *J Infect Dis* 142: 676–684.
3. Atyeo RF, Oxberry SL, Combs BG, Hampson DJ (1998) Development and evaluation of polymerase chain reaction tests as an aid to diagnosis of swine dysentery and intestinal spirochaetosis. *Lett Appl Microbiol* 26: 126-130.
4. Atyeo RF, Stanton TB, Jensen NS, Suriyaarachichi DS, Hampson DJ (1999) Differentiation of *Serpulina* species by NADH oxidase gene (nox) sequence comparisons and nox-based polymerase chain reaction tests. *Vet Microbiol* 67: 47-60.
5. Baratta MT, Dorman HD, Deans SG, Biondi DM, Ruberto G (1998) Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. *J Essent Oil Res* 10: 618-627.
6. Barcellos DE, de Uzeda M, Ikuta N, Lunge VR, Fonseca AS, Kader II, Duhamel GE (2000) Identification of porcine intestinal spirochetes by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of ribosomal DNA encoding 23S rRNA. *Vet Microbiol* 75: 189–198.
7. Bellgard MI, Wanchanthuek P, La T, Ryan K, Moolhuijzen P, Albertyn Z, Shaban B, Motro Y, Dunn DS, Schibeci D, Hunter A, Barrero R, Phillips ND, Hampson D (2009) Genome sequence of the pathogenic intestinal spirochete *Brachyspira hyodysenteriae* reveals adaptations to its lifestyle in the porcine large intestine. *PLoS One* 4: e4641.

8. Bedford M, Cowieson A (2012) Exogenous enzymes and their effects on intestinal microbiology. *Anim Feed Sci Technol* 173: 76-85.
9. Bengtsson B, Wierup M (2006) Antimicrobial resistance in Scandinavia after a ban of antimicrobial growth promoters. *Anim Biotechnol* 17: 147-156.
10. Biagia G, Cipollini I, Paulicks BR, Roth FX (2010) Effect of tannins on growth performance and intestinal ecosystem in weaned piglets. *Arch Anim Nutr* 64: 121-135.
11. Bošnjak-Neumüller J, Radaković M, Djelić N, Vuković-Gačić B, Dajić Stevanović Z, Kolarević S, Mišić D, Stanković M, Knežević-Vukčević J, Spremo-Potparević B, Stanimirović Z (2017) *Nepeta rtanjensis* (Lamiaceae), a plant endemic to the Balkans: Phenolic composition, antioxidant activity, and *in vitro* antigenotoxic effects in triiodothyronine-induced DNA damage in human lymphocytes. *Pak J Pharm Sci* 30: 625-634.
12. Bowden CA, Joens LA, Kelley LM (1989) Characterization of the attachment of *Treponema hyodysenteriae* to Henle intestinal epithelial cells *in vitro*. *Am J Vet Res* 50: 1481–1485.
13. Boye M, Jensen TK, Moller K, Leser TD, Jorsal SE (1998) Specific detection of the genus *Serpulina*, *S. hyodysenteriae* and *S. pilosicoli* in porcine intestines by fluorescent rRNA *in situ* hybridization. *Mol Cell Probes* 12: 323–330.
14. Boye M, Baloda SB, Leser TD, Moller K (2001) Survival of *Brachyspira hyodysenteriae* and *B. pilosicoli* in terrestrial microcosms. *Vet Microbiol* 81: 33–40.
15. Boyen F, Haesebrouck F, Vanparrys A, Volf J, Mahu M, Van Immerseel F, Rychlik I, Dewulf J, Ducatelle R, Pasmans F (2008) Coated fatty acids alter virulence properties of *Salmonella typhimurium* and decrease intestinal colonization of pigs. *Vet Microbiol* 132: 319-327.
16. Brus M, Dolinšek J, Cencič, A, Škorjanc D (2013) Effect of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) wood tannins and organic acids on growth performance and faecal microbiota of pigs from 23 to 127 days of age. *Bulg J Agric Sci* 19: 841-847.

17. Calderaro A, Piccolo G, Montecchini S, Buttrini M, Gorrini C, Rossi S, Arcangeletti MC, De Conto F, Medici MC, Chezzi C (2013) MALDI-TOF MS analysis of human and animal *Brachyspira* species and benefits of database extension. *J Proteomics* 78: 273–280.
18. Canale-Parola E (1984) Genus I. *Spirochaeta* Ehrenberg 1835, In: Krieg NR and Holt JG (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 1, The Williams & Wilkins Co. Baltimore, 39–46.
19. Carpenter JA, Charbonneau G, Josephson G (2005) Tiamulin and narasin toxicosis in nursery pigs. *J Swine Health Prod* 13: 333–336.
20. Chen Q, Tang S, Jin X, Zou J, Chen K, Zhang T, Xiao X (2009) Investigation of the genotoxicity of quinocetone, carbadox and olaquinox in vitro using Vero cells. *Food Chem Toxicol* 47: 328-334.
21. Chia SP, Taylor DJ (1978) Factors affecting the survival of *Treponema hyodysenteriae* in dysenteric pig faeces. *Vet Rec* 103: 68-70.
22. Choi S, Ingale S, Kim J, Park Y, Kwon I, Chae B (2013) An antimicrobial peptide-A3: effects on growth performance, nutrient retention, intestinal and faecal microflora and intestinal morphology of broilers. *Br Poult Sci* 54: 738-746.
23. CLSI (2015) VET01S Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Penn., USA.
24. CLSI (2016) M45-Ed3 Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Penn., USA.
25. CLSI (2017) M100-S27 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Penn., USA.
26. Cogliani C, Goossens H, Greko C (2011) Restricting antimicrobial use in food animals: lessons from Europe. *Microbe* 6: 274-279.
27. Combs BG, Hampson DJ, Harders SJ (1992) Typing of Australian isolates of *Treponema hyodysenteriae* by serology and by DNA restriction endonuclease analysis *Vet Microbiol* 31: 273–285.

28. Costa LB, Panhoza Tse ML, Miyada VS (2007) Herbal extracts as alternatives to antimicrobial growth promoters for weanling pigs. *Braz J Anim Sci* 36: 589–595.
29. Cullen PA, Coutts SA, Cordwell SJ, Bulach DM, Adler B Characterization of a locus encoding four paralogous outer membrane lipoproteins of *Brachyspira hyodysenteriae*. *Microbes Infect* 5: 275–283.
30. Davis AJ, Smith SC, Moore RJ (2005) The *Brachyspira hyodysenteriae* *ftnA* gene: DNA vaccination and Real-Time PCR quantification of bacteria in a mouse model of disease. *Curr Microbiol* 50: 285-291.
31. de Graaf GJ, Jager LP, Baars AJ, Spierenburg TJ (1988) Some pharmacokinetic observations of carbadox medication in pigs. *Vet Q* 10: 34–41.
32. De Lange C, Pluske J, Gong J, Nyachoti C (2010) Strategic use of feed ingredients and feed additives to stimulate gut health and development in young pigs. *Livest Sci* 134: 124-134.
33. Delić N, Drašković V, Stevanović J, Savić B, Lakić N, Bošnjak-Neumüller J, Stanimirović Z (2018) The efficacy of two phytogetic feed additives in a control of swine dysentery. *Acta Vet-Beograd* 68: 178-189.
34. de Nova PJ, Carvajal A, Prieto M, Rubio P (2017) In vitro susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae* to a commercial citrus fruit extract. *Res Vet Sci* 115: 318-324.
35. Diego R, Lanza I, Carvajal A, Rubio P, Cármenes P (1995) *Serpulina hyodysenteriae* challenge of fattening pigs vaccinated with an adjuvanted bivalent bacterin against swine dysentery. *Vaccine* 13: 663–667.
36. Donaldson JR, Warner SL, Cates RG, Young DG (2005) Assessment of antimicrobial activity of fourteen essential oils when using dilution and diffusion methods. *Pharm Biol* 43: 687-695.
37. Drašković V, Bosnjak-Neumüller J, Vasiljevic M, Petrujkic B, Aleksic N, Kukulj V, Stanimirovic Z (2018) Influence of phytogetic feed additive on *Lawsonia intracellularis* infection in pigs, *Prev Vet Med* 151: 46-51.
38. Duinhof TF, Dierikx CM, Koene MG, van Bergen MA, Mevius DJ, Veldman KT, van Beers-Schreurs HM, de Winne RT (2008) Multiresistant

Brachyspira hyodysenteriae in a Dutch sow herd. *Tijdschr Diergeneesk* 133: 604-608.

39. Eckel B, Kirchgessner M, Roth F (1992) Influence of formic acid on daily weight gain, feed intake, feed conversion rate and digestibility, 1: investigations about the nutritive efficacy of organic acids in the rearing of piglets. *J Anim Physiol Anim Nutr* 67: 93-100.
40. FDA, Food and Drug Administration, 2013. Part 182 - Substances Generally Recognized As Safe. CFR - Code of Federal Regulations Title 21. U.S. Food and Drug Administration.
41. FDA (2015) U.S. Food and Drug Administration (2015) Summary report on antimicrobials sold or distributed for use in food-producing animals. <http://www.fda.gov/downloads/ForIndustry/UserFees/AnimalDrugUserFeeActADUFA/UCM476258.pdf> (accessed May 8, 2016).
42. Fellström C, Pettersson B, Thomson J, Gunnarsson A, Persson M, Johansson KE (1997) Identification of *Serpulina* species associated with porcine colitis by biochemical analysis and PCR. *J Clin Microbiol* 35: 462–467.
43. Fellström C, Zimmerman U, Aspan A, Gunnarsson A (2001) The use of culture, pooled samples and PCR for identification of herds infected with *Brachyspira hyodysenteriae*. *Anim Health Res Rev* 2: 37-43.
44. Frankič T, Voljc M, Salobir J, Rezar V (2009) Use of herbs and spices and their extracts in animal nutrition. *Acta Agriculturae Slovenica* 94: 95-102.
45. Gabe JD, Chang RJ, Slomiany R, Andrews WH, McCaman MT (1995) Isolation of extracytoplasmic proteins from *Serpulina hyodysenteriae* B204 and molecular cloning of the flaB1 gene encoding a 38-kilodalton flagellar protein. *Infect Immun* 63: 142–148.
46. Glock RD, Harris DL (1972) Swine dysentery. II. Characterization of lesions in pigs inoculated with *Treponema hyodysenteriae* in pure and mixed culture. *Vet Med Small Anim Clin* 67: 65–68.
47. Glock RD, Harris DL, Kluge JP (1974) Localization of spirochaetes with the structural characteristics of *Treponema hyodysenteriae* in lesions of swine dysentery. *Infect Immun* 9: 161-178.

48. Glock RD, Vanderloo KJ, Kinyon JM (1975) Survival of certain pathogenic organisms in swine lagoon effluent. *J Am Vet Med Assoc* 166: 277-278.
49. Gong J, Yin F, Hou Y, Yin Y (2013) Review: Chinese herbs as alternatives to antibiotics in feed for swine and poultry production: potential and challenges in application. *Can J Anim Sci* 94: 223-241.
50. Greer JM, Wannemuehler MJ (1989) Pathogenesis of *Treponema hyodysenteriae*: induction of interleukin-1 and tumor necrosis factor by a treponemal butanol/water extract (endotoxin). *Microb Pathog* 7: 279–288.
51. Gregačević L, Klarić I, Domaćinović M, Galović D, Ronta M (2014) Fitogeni aditivi u hranidbi domaćih životinja. *Krmiva* 56: 117-123.
52. Halter MR, Joens LA (1988) Lipooligosaccharides from *Treponema hyodysenteriae* and *Treponema innocens*. *Infect Immun* 56: 3152–3156.
53. Hampson DJ, La T, Adler B, Trott DJ (2006) Proposed revisions to the nomenclature for *Brachyspira* membrane proteins and lipoproteins. *Microbiology* 152: 1–2.
54. Hampson DJ (2012) Brachyspiral colitis. In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW (eds.) *Diseases of swine*, Tenth Edition. John Wiley & Sons, Inc., pp. 680-696.
55. Hansen CF, Phillips ND, La T, Hernandez A, Mansfield J, Kim JC, Mullan BP, Hampson DJ, Pluske JR (2010) Diets containing inulin but not lupins help to prevent swine dysentery in experimentally challenged pigs 1. *J Anim Sci* 88: 3327–3336.
56. Harris DL, Glock RD, Christensen CR, Kinyon JM (1972) Inoculation of pigs with *Treponema hyodysenteriae* (new species) and reproduction of the disease. *Vet Med Small Anim Clin* 67: 61–64.
57. Hartnack S, Nathues C, Nathues H, Grosse Beilage E, Lewis FI (2014) Estimating diagnostic test accuracies for *Brachyspira hyodysenteriae* accounting for the complexities of population structure in food animals. *PLOS One* 9: e98534.
58. Hashemi SR, Davoodi H (2011) Herbal plants and their derivatives as growth and health promoters in animal nutrition. *Vet Res Commun* 35, 169–180.

59. Heo J, Opapeju F, Pluske J, Kim J, Hampson D, Nyachoti C (2013) Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds. *J Anim Physiol Anim Nutr* 97: 207-237.
60. Hidalgo Á, Carvajal A, La T, Naharro G, Rubio P, Phillips ND, Hampson DJ (2010a) Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis of the swine dysentery pathogen, *Brachyspira hyodysenteriae*. *J Clin Microbiol* 48: 2859–2865.
61. Hidalgo Á, Carvajal A, Pringle M, Rubio P, Fellström C (2010b) Characterization and epidemiological relationships of Spanish *Brachyspira hyodysenteriae* field isolates. *Epidemiol Infect* 138: 76–85.
62. Hidalgo Á, Carvajal A, Vester B, Pringle M, Naharro G, Rubio P (2011) Trends towards lower antimicrobial susceptibility and characterization of acquired resistance among clinical isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* in Spain. *Antimicrob Agents Ch* 55: 3330-3337.
63. Hommez J, Devriese LA, Castryck F, Miry C, Lein A, Haesebrouck F (1998) Susceptibility of different *Serpulina* species in pigs to antimicrobial agents. *Vlaams Diergen Tijdschr* 67: 32–35
64. Hsu T, Hutto DL, Minion FC, Zuerner RL, Wannemuehler MJ (2001) Cloning of a Beta-Hemolysin Gene of *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae* and Its Expression in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 69: 706–711.
65. Huang Q, Liu X, Zhao G, Hu T, Wang Y (2017) Potential and challenges of tannins as an alternative to in-feed antibiotics for farm animal production. *Animal Nutrition*, DOI: 10.1016/j.aninu.2017.09.004
66. Hudson MJ, Alexander TJ, Lysons RJ, Prescott JF (1976) Swine dysentery: protection of pigs by oral and parenteral immunisation with attenuated *Treponema hyodysenteriae*. *Res Vet Sci* 21: 366–367.
67. Hughes R, Olander HJ, Kanitz DL, Qureshi S (1977) A study of swine dysentery by immunofluorescence and histology. *Vet Pathol* 14: 490–507
68. Humphrey SB, Stanton TB, Jensen NS, Zuerner RL (1997) Purification and characterization of VSH-1, a generalized transducing bacteriophage of *Serpulina hyodysenteriae*. *J Bacteriol* 179: 323–329.

69. Hyatt DR, ter Huurne AAHM, Van der Zeist BAM, Joens LA (1994) Reduced virulence of *Serpulina hyodysenteriae* hemolysin-negative mutants in pigs and their potential to protect pigs against challenge with a virulent strain. *Infect Immun* 62: 2244–2248.
70. Jacela JY, DeRouchey JM, Tokach MD, Goodband RD, Nelssen JL, Renter DG, Dritz SS (2010) Feed additives for swine: fact sheets – prebiotics and probiotics, and phytogenics. *J Swine Health Prod* 18: 132–136.
71. Jacobson M, Fellström C, Lindberg R, Wallgren P, Jensen-Waern M (2004) Experimental swine dysentery: comparison between infection models. *J Med Microbiol* 53: 273–280.
72. Jakab L, Kutasi J, Rafai P, Könyves L, Jurkovich V, Kovács P, Bata Á, Brydl E (2011) Prevention of swine dysentery with fitobiotics. In: *Animal hygiene and sustainable livestock production*. Proceedings of the XVth International Congress of the International Society for Animal Hygiene, Vienna, Austria, 3-7 July 2011, Volume 1, pp. 407-409. Tribun EU, 2011.
73. Jenkins EM, Mohammad A, Klesius PH. 1982. Evaluation of cellmediated immune response to *Treponema hyodysenteriae*. In 6th Proc. Congr. Int. Pig Vet. Soc., p. 41.
74. Jenkinson SR, Wingar CR (1981) Selective medium for the isolation of *Treponema hyodysenteriae*. *Vet Rec* 109: 384–385.
75. Joens LA, Glock RD, Whipp SC, Robinson IM, Harris DL (1981) Location of *Treponema hyodysenteriae* and synergistic anaerobic bacteria in colonic lesions of gnotobiotic pigs. *Vet Microbiol* 6: 69–77.
76. Joens LA, Nord NA, Kinyon JM, Egan IT (1982) Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibody to *Treponema hyodysenteriae* antigens. *J Clin Microbiol* 15: 249–252.
77. Joens LA, Whipp SC, Glock RD, Nuessen ME (1983) Serotype-specific protection against *Treponema hyodysenteriae* infection in ligated colonic loops of pigs recovered from swine dysentery. *Infect Immun* 39: 460–462.
78. Joens LA, DeYoung DW, Glock RD, Mapother ME, Cramer JD (1985) Passive protection of segmented swine colonic loops against swine dysentery. *Am J Vet Res* 46: 2369–2371.

79. Jonasson R, Johannisson A, Jacobson M, Fellström C, Jensen-Waern M (2004) Differences in lymphocyte subpopulations and cell counts before and after experimentally induced swine dysentery. *J Med Microbiol* 53: 267-272.
80. Jonasson R, Andersson M, Råsbäck T, Johannisson A, Jensen-Waern M (2006) Immunological alterations during the clinical and recovery phases of experimental swine dysentery. *J Med Microbiol* 55: 845–855.
81. Jonasson R, Essén-Gustavsson B, Jensen-Waern M (2007) Blood concentrations of amino acids, glucose and lactate during experimental swine dysentery. *Res Vet Sci* 82: 323–331.
82. Jordan DM, Knittel JP, Roof MB, Schwartz K, Larson D, Hoffman LJ (1999) Detection of *Lawsonia intracellularis* in swine using polymerase chain reaction methodology. *J Vet Diagn Invest* 11: 45–49.
83. Jouany JP, Morgavi DP (2007) Use of ‘natural’ products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. *Animal* 1: 1443–1466.
84. Jugl-Chizzola M, Spargser J, Schilcher F, Novak J, Bucher A, Gabler C, Hagemüller W, Zitterl-Eglseer K (2004) Effects of *Thymus vulgaris* L. as feed additive in piglets and against haemolytic *E. coli in vitro*. *Berl Münch Tierärztl* 118: 495-501.
85. Karlsson M, Fellström C, Heldtander MU, Johansson KE, Franklin A (1999) Genetic basis of macrolide and lincosamide resistance in *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*. *FEMS Microbiol Lett* 172: 255–260.
86. Karlsson M, Fellström C, Gunnarsson A, Landén A, Franklin A (2003) Antimicrobial susceptibility testing of porcine *Brachyspira (Serpulina)* species isolates. *J Clin Microbiol* 41: 2596–2604
87. Karlsson M, Aspán A, Landén A, Franklin A (2004) Further characterization of porcine *Brachyspira hyodysenteriae* isolates with decreased susceptibility to tiamulin. *J Med Microbiol* 53: 281–285.
88. Kennedy MJ, Rosnick DK, Ulrich RG, Yancey RJ (1988) Association of *Treponema hyodysenteriae* with porcine intestinal mucosa. *J Gen Microbiol* 134: 1565–1567.

89. Kennedy MJ, Rosnick DK, Ulrich RG, Yancey RJ Jr (1992) Identification and immunological characterisation of the major immunogenic antigens of serotypes 1 and 2 of *Serpulina hyodysenteriae*. In 12th Proc Congr Int Pig Vet Soc, p. 273.
90. Kennedy MJ, Rosey EL, Yancey RJ Jr (1997) Characterization of flaA- and flaB- mutants of *Serpulina hyodysenteriae*: both flagellin subunits, FlaA and FlaB, are necessary for full motility and intestinal colonization. *FEMS Microbiol Lett* 153: 119-128.
91. Kiarie E, Romero LF, Nyachoti CM (2013) The role of added feed enzymes in promoting gut health in swine and poultry. *Nutr Res Rev* 26: 71-88.
92. Kinyon JM, Harris DL, Glock RD (1977) Enteropathogenicity of various isolates of *Treponema hyodysenteriae*. *Infect Immun* 15: 638–646.
93. Kinyon JM, Harris DL (1979) *Treponema innocens*, a new species of intestinal bacteria, and emended description of the type strain of *Treponema hyodysenteriae* Harris et al. *Int J Syst Bacteriol* 29: 102–109.
94. Klose V, Bruckbeck R, Henikl S, Schatzmayr G, Loibner AP (2010) Identification and antimicrobial susceptibility of porcine bacteria that inhibit the growth of *Brachyspira hyodysenteriae* in vitro. *J Appl Microbiol* 108: 1271–1280.
95. Knoop FC, Schrank GD, Ferraro FM (1979) In vitro attachment of *Treponema hyodysenteriae* to mammalian epithelial cells. *Can J Microbiol* 25: 399-405.
96. Kroismayr A, Steiner T, Zhang C (2006) Influence of a phytogetic feed additive on performance of weaner piglets. *J Anim Sci* 84 (suppl 1) Abstract 329.
97. Kroismayr A, Sehm J, Pfaffl M, Plitzner C, Foissy H, Etle T, Mayer H, Schreiner M, Windisch W (2008) Effects of essential oils or Avilamycin on gut microbiology and blood parameters of weaned piglets. *Czech J Anim Sci* 53: 377-387.
98. Kroll JJ, Eichmeyer MA, Schaeffer ML, McOrist S, Harris DL, Roof MB (2005) Lipopolysaccharide-based enzyme-linked immunosorbent assay for experimental use in detection of antibodies to *Lawsonia intracellularis* in pigs. *Clin Diagn Lab Immunol* 12: 693–699.

99. Kulathunga D, Rubin JE (2017) A review of the current state of antimicrobial susceptibility test methods for *Brachyspira*. *Can J Microbiol* 63: 465-474.
100. Kumar M, Kumar V, Roy D, Kushwaha R, Valswani S (2014) Application of herbal feed additives in animal nutrition – a review. *Int J Livestock Res* 4: 1-8.
101. Kunkle RA, Kinyon JM (1988) Improved selective medium for the isolation of *Treponema hyodysenteriae*. *J Clin Microbiol* 26: 2357–2360.
102. Kutasi J, Jakab L, Jurkovich V, Rafai P (2016) The *in vitro* effect of Garden Thyme (*Thymus vulgaris* L.) extract on *Brachyspira hyodysenteriae*. *Acta Microbiol Imm H* 63: 467-473.
103. La T, Hampson DJ (2001) Serologic detection of *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae* infections. *Anim Health Res Rev* 2: 45–52.
104. La T, Phillips ND, Hampson DJ (2003) Development of a duplex PCR assay for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* in pig feces. *J Clin Microbiol* 41: 3372-3375.
105. La T, Phillips ND, Reichel MP, Hampson DJ (2004) Protection of pigs from swine dysentery by vaccination with recombinant BmpB, a 29.7 kDa outer-membrane lipoprotein of *Brachyspira hyodysenteriae*. *Vet Microbiol* 102: 97–109.
106. La T, Collins AM, Phillips ND, Oksa A, Hampson DJ (2006) Development of a multiplex-PCR for rapid detection of the enteric pathogens *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, and *Brachyspira pilosicoli* in porcine faeces. *Lett Appl Microbiol* 42: 284-288.
107. La T, Phillips ND, Hampson DJ (2009a) Evaluation of recombinant Bhlp29.7 as an ELISA antigen for detecting pig herds with swine dysentery. *Vet Microbiol* 133: 98–104.
108. La T, Phillips ND, Harland BL, Wanchanthuek P, Bellgard MI, Hampson DJ (2009b) Multilocus sequence typing as a tool for studying the molecular epidemiology and population structure of *Brachyspira hyodysenteriae*. *Vet Microbiol* 138: 330–338.

109. Lee JI, Hampson DJ, Combs BG, Lymbery AJ (1993) Genetic relationships between isolates of *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae*, and comparison of methods for their subspecific differentiation. *Vet Microbiol* 34: 35–46.
110. Li P, Piao X, Ru Y, Han X, Xue L, Zhang H (2012) Effects of adding essential oil to the diet of weaned pigs on performance, nutrient utilization, immune response and intestinal health. *Asian-Australas J Anim Sci* 25: 1617-1626.
111. Liu Y (2015) Fatty acids, inflammation and intestinal health in pigs. *J Anim Sci Biotechnol* 6: 41.
112. Leser TD, Møller K, Jensen TK, Jorsal SE (1997) Specific detection of *Serpulina hyodysenteriae* and potentially pathogenic weakly beta-haemolytic porcine intestinal spirochetes by polymerase chain reaction targeting 23S rDNA. *Mol Cell Probes* 11: 363-372.
113. Leser TD, Lindecrona RH, Jensen TK, Jensen BB, Møller K (2000) Changes in bacterial community structure in the colon of pigs fed different experimental diets and after infection with *Brachyspira hyodysenteriae*. *Appl Environ Microbiol* 66: 3290–3296.
114. Lobova D, Smola J, Cizek A (2004) Decreased susceptibility to tiamulin and valnemulin among Czech isolates of *Brachyspira hyodysenteriae*. *J Med Microbiol* 53: 287-291.
115. Lončarević A (1997) Zdravstvena zaštita svinja u intenzivnom uzgoju. Beograd, Naučni Institut za Veterinarstvo Srbije-NIVS. pp:1-529.
116. Loncarevic S, Danielsson-Tham ML, Mårtensson L, Ringnér Å, Runehagen A, Tham W (1997) A case of foodborne listeriosis in Sweden. *Lett Appl Microbiol.* 24: 65-68.
117. Maksimović N, Milovanović A, Barna T, Delić N, Stefanov R, Pantelić V, Taushanova P (2017) Effects of prostaglandin and HCG on out of season oestrus synchronization and fertility and assessment of progesterone concentration for early pregnancy diagnosis in ewes. *Cr Acad Bulg Sci* 70: 885-894.
118. Maletić J, Djelić N, Radaković M, Maletić M, Lakić N, Kukulj V, Aleksić N, Andjelković M, Stanimirović Z (2015) Evaluation of DNA damage in rat

lymphocytes exposed to tulathromycin *in vitro*. *Genetika-Belgrade* 47: 339-348.

119. Manzanilla EG, Perez JF, Martin M, Kamel C, Baucells F, Gasa J (2004) Effect of plant extracts and formic acid on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. *J Anim Sci* 82: 3210–3218.
120. Marković B, Stanimirović Z, Vučinić M, Čupić V (2000a) Examination of Carbadox genotoxicity *in vitro* and *in vivo*. *Acta Vet-Beograd* 50: 387-396.
121. Marković B, Stanimirović Z, Bajić V (2000b) The genotoxicity of Carbadox *in vitro*. Abstracts from EEMS-2000 (30th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society) Vol 86, Aug 22-26, 105. Budapest, Hungary.
122. Marković B, Stanimirović Z, Djelić N, Andjelković M (2002a) Evaluation of genotoxic effects of ipronidazol (Gastrogal 10[®]) in cultures of human peripheral blood lymphocytes. *Acta Vet-Beograd* 52: 273-280.
123. Marković B, Djelić N, Stanimirović Z, Bajić V (2002b) The genotoxicity of Tiamulin S on cultured human lymphocytes. 32nd Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society - EEMS 2002, Sept. 3-7. Warsaw, Poland.
124. Marković B, Stanimirović Z, Djelić N (2004) Evaluation of the genotoxic effects of Tiamulin S – *in vivo*. *Acta Vet-Beograd* 54: 239-246.
125. Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Maguire D (2013) *Clinical Veterinary Microbiology* (2nd Edition). Mosby Ltd, Elsevier.
126. Maron DF, Smith TJ, Nachman KE (2013) Restrictions on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey. *Global Health* 9: 48.
127. Matson EG, Thompson MG, Humphrey SB, Zuerner RL, Stanton TB (2005) Identification of genes of VSH-1, a prophage-like gene transfer agent of *Brachyspira hyodysenteriae*. *J Bacteriol* 187: 5885–5892.
128. McCaman MT, Auer K, Foley W, Gabe JD (2003) *Brachyspira hyodysenteriae* contains eight linked gene copies related to an expressed 39-kDa surface protein. *Microbes Infect* 5: 1–6.

129. Milner JA, Sellwood R (1994) Chemotactic response to mucin by *Serpulina hyodysenteriae* and other porcine spirochetes: potential role in intestinal colonization. *Infect Immun* 62: 4095–4099
130. Mirajkar NS, Davies PR, Gebhart CJ (2016) Antimicrobial susceptibility patterns of *Brachyspira* species isolated from swine herds in the United States. *J Clin Microbiol* 54: 2109-2119.
131. Monzote L, Alarcón O, Setzer WN (2012) Antiprotozoal Activity of Essential Oils. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 77: 167-175.
132. Mølbak L, Thomsen LE, Jensen TK, Bach Knudsen KE, Boye M (2007) Increased amount of *Bifidobacterium thermacidophilum* and *Megasphaera elsdenii* in the colonic microbiota of pigs fed a swine dysentery preventive diet containing chicory roots and sweet lupine. *J Appl Microbiol* 103: 1853–1867.
133. Møller K, Jensen TK, Jorsal SE, Leser TD, Carstensen B (1998) Detection of *Lawsonia intracellularis*, *Serpulina hyodysenteriae*, weakly beta-haemolytic intestinal spirochaetes, *Salmonella enterica*, and haemolytic *Escherichia coli* from swine herds with and without diarrhoea among growing pigs. *Vet Microbiol* 62: 59-72.
134. Mroz Z (2005) Organic acids as potential alternatives to antibiotic growth promoters for pigs. *Advances in Pork Production* 16: 169-182.
135. Musa HH, Wu SL, Zhu CH, Seri HI, Zhu GQ (2009) The Potential Benefits of Probiotics in Animal Production and Health. *J Anim Vet Adv* 8: 313-321.
136. Namkung H, Li M, Gong J, Yu H, Cottrill M, De Lange CFM (2004). Impact of feeding blends of organic acids and herbal extracts on growth performance, gut microbiota and digestive function in newly weaned pigs. *Can J Anim Sci* 84, 697–704.
137. Naresh R, Hampson DJ (2010) Attraction of *Brachyspira pilosicoli* to mucin. *Microbiology* 156: 191–197.
138. Nibbelink SK, Sacco RE, Wannemuehler MJ (1997) Pathogenicity of *Serpulina hyodysenteriae*: in vivo induction of tumor necrosis factor and interleukin-6 by a serpulinal butanol/water extract (endotoxin). *Microb Pathog* 23: 181–187.

139. NRC (2012) *Nutrient Requirements of Swine*. Eleventh Revised Edition, Nat. Acad. Press, Washington, DC.
140. Nuessen ME, Joens LA, Glock RD (1983) Involvement of lipopolysaccharide in the pathogenicity of *Treponema hyodysenteriae*. *J Immunol* 131: 997–999.
141. Ochiai S, Adachi Y, Mori K. (1997) Unification of the genera *Serpulina* and *Brachyspira*, and Proposals of *Brachyspira hyodysenteriae* Comb. Nov., *Brachyspira innocens* Comb. Nov. and *Brachyspira pilosicoli* Comb. Nov. *Microbiol Immunol* 41: 445–452.
142. Oetting LL, Utiyama CE, Giani PA, Ruiz UD, Miyada VS (2006) Effects of herbal extracts and antimicrobials on apparent digestibility, performance, organs morphometry and intestinal histology of weanling pigs. *Braz J Anim Sci* 35: 1389–1397.
143. Ohya T, Sueyoshi M (2010) In vitro antimicrobial susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae* strains isolated in Japan from 1985 to 2009. *J Vet Med Sci* 72: 1651–1653.
144. Olson LD, Dayalu KI, Schlink GT. (1994) Exacerbated onset of dysentery in swine vaccinated with inactivated adjuvanted *Serpulina hyodysenteriae*. *Am J Vet Res* 55: 67–71.
145. Omonijo FA, Ni L, Gong J, Wang Q, Lahaye L, Yang C (2017) Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. *Animal Nutrition*, DOI: 10.1016/j.aninu.2017.09.001.
146. Papatsiros VG, Tzika ED, Papaioannou DS, Kyriakis SC, Tassis PD, Kyriakis CS (2009) Effect of *Origanum vulgare* and *Allium sativum* extracts for the control of proliferative enteropathy in weaning pigs. *Pol J Vet Sci* 12: 407-414.
147. Papatsiros VG, Tzika ED, Tassis PD, Kantas D, Filippopoulos LC, Papaioannou DS (2011) Greek experience of the use of phyto-genic feed additives in organic pig farming. *J Cell Anim Biol* 5: 320-323.
148. Papatsiros VG, Katsoulos PD, Koutoulis KC, Karatzia M, Dedousi A, Christodouloupoulos G (2013) Alternatives to antibiotics for farm animals. *CAB Reviews* 8: 1-15.

149. Parizek R, Stewart R, Brown K, Blevins D (1985) Protection against swine dysentery with an inactivated *Treponema hyodysenteriae* bacterin. *Vet Med* 80: 80–86.
150. Parys AV, Boyen F, Dewulf J, Haesebrouck F, Pasmans F (2010) The use of tannins to control *Salmonella typhimurium* infections in pigs. *Zoonoses Public Health* 57: 423-428.
151. Pati A, Sikorski J, Gronow S, Munk C, Lapidus A, Copeland A, Del Tio TG, Nolan M, Lucas S, Chen F, Tice H (2010) Complete genome sequence of *Brachyspira murdochii* type strain (56-150 T). *Stand Genomic Sci* 2: 260–269.
152. Perez JBDS, Rubin JE, Fernando C, Harding JCS, Hill JE (2016) Characterization of “*Brachyspira hamptonii*” clades I and II isolated from commercial swine in Western Canada. *FACETS* 1: 163–172.
153. Petrujkić BT, Beier RC, He H, Genovese KJ, Swaggerty CL, Hume ME, Crippen TL, Harvey RB, Anderson RC, Nisbet DJ (2018) *Nigella sativa* L. as an alternative antibiotic feed supplement and effect on growth performance in weanling pigs. *J Sci Food Agric* 98: 3175-3181.
154. Pluske JR, Siba PM, Pethick DW, Durmic Z, Mullan BP, Hampson DJ (1996) The incidence of swine dysentery in pigs can be reduced by feeding diets that limit the amount of fermentable substrate entering the large intestine. *J Nutr* 126: 2920–2933.
155. Polson DD, Marsh WE, Harris DL. (1992) Financial considerations for individual herd eradication of swine dysentery. In 12th Proc Congr Int Pig Vet Soc, p. 510.
156. Prášek J, Šperling D, Lobová D, Smola J, Čížek A (2014) Antibiotic susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae* isolates from Czech swine farms: a 10-year study. *Acta Vet Brno* 83: 3-7.
157. Pringle M, Poehlsgaard J, Vester B, Long KS (2004) Mutations in ribosomal protein L3 and 23S ribosomal RNA at the peptidyl transferase centre are associated with reduced susceptibility to tiamulin in *Brachyspira* spp. isolates. *Mol Microbiol* 54: 1295–1306.

158. Prohaska S, Pflüger V, Ziegler D, Scherrer S, Frei D, Lehmann A, Wittenbrink MM, Huber H (2014) MALDI-TOF MS for identification of porcine *Brachyspira* species. *Lett Appl Microbiol* 58: 292–298.
159. Pyörälä S, Baptiste KE, Catry B, Van Duijkeren E, Greko C, Moreno MA, Pomba MCMF, Rantala M, Ružauskas M, Sanders P, Threlfall EJ (2014) Macrolides and lincosamides in cattle and pigs: use and development of antimicrobial resistance. *Vet J* 200: 230-239.
160. Råsbäck T, Fellstrom C, Gunnarsson A, Aspan A (2006) Comparison of culture and biochemical tests with PCR for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli*. *J Microbiol Methods* 66: 347–353.
161. Råsbäck T, Johansson KE, Jansson DS, Fellström C, Alikhani MY, La T, Dunn DS, Hampson DJ (2007) Development of a multilocus sequence typing scheme for intestinal spirochaetes within the genus *Brachyspira*. *Microbiology* 153: 4074–4087.
162. Rátz V1, Laczay P, Móra Z, Csikó G, Monostori K, Vereczkey L, Lehel J, Semjén G (1997) Recent studies on the effects of tiamulin and monensin on hepatic cytochrome P450 activities in chickens and turkeys. *J Vet Pharmacol Therap* 20: 415-418.
163. Rees AS, Lysons RJ, Stokes CR, Bourne FJ (1989a) Antibody production by the pig colon during infection with *Treponema hyodysenteriae*. *Res Vet Sci* 47: 263–269.
164. Rees AS, Lysons RJ, Stokes CR, Bourne FJ (1989b) The effect of parenteral immunisation on antibody production in the pig colon. *Vet Immunol Immunopathol* 47: 263–269.
165. Robinson IM, Whipp SC, Bucklin JA, Allison MJ. (1984) Characterization of predominant bacteria from the colons of normal and dysenteric pigs. *Appl Environ Microbiol* 48: 964–969.
166. Rohde J, Rothkamp A, Gerlach GF (2002) Differentiation of porcine *Brachyspira* species by a novel nox PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 40: 2598–2600.

167. Rohde J, Habighorst-Blome K, Seehusen F (2014) “*Brachyspira hampsonii*” clade I isolated from Belgian pigs imported to Germany. *Vet Microbiol* 168: 432–435.
168. Rosey EL, Kennedy MJ, Yancey RJ (1996) Dual flaA1 flaB1 mutant of *Serpulina hyodysenteriae* expressing periplasmic flagella is severely attenuated in a murine model of swine dysentery. *Infect Immun* 64: 4154–4162.
169. Rubin JE, Costa MO, Hill JE, Kittrell HE, Fernando C, Huang Y, O’Connor B, Harding JC (2013) Reproduction of mucohaemorrhagic diarrhea and colitis indistinguishable from swine dysentery following experimental inoculation with “*Brachyspira hampsonii*” strain 30446. *PLoS One* 8: e57146.
170. Rugna G, Bonilauri P, Carra E, Bergamini F, Luppi A, Gherpelli Y, Magistrali CF, Nigrelli A, Alborali GL, Martelli P, La T, Hampson DJ, Merialdi G (2015) Sequence types and pleuromutilin susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae* isolates from Italian pigs with swine dysentery: 2003-2012. *Vet J* 203: 115–119.
171. Savić B, Radanović O, Cvetojević Dj, Kureljušić B (2016) *Brachyspira* spp identified in growing pigs in Serbia. Proceedings of the Second International Symposium of Veterinary Medicine – ISVM2016. Belgrade June 22–24, 2016. pp 110.
172. Savić B, Radanović O, Cvetojević Dj, Stevančević O, Stojanac N, Nešić K, Kureljušić B, Savić B (2017) Multi locus sequence typing of *Brachyspira hyodysenteriae* isolates from pigs on Serbian farms. *Berl Münch Tierärztl* 130: 332-336.
173. Schmall MS, Argenzio RA, Whipp SC (1983) Pathophysiologic features of swine dysentery: cyclic nucleotide-independent production of diarrhea. *Am J Vet Res* 44: 1309–1316.
174. Sellwood R, Bland AP (1997) Ultrastructure of intestinal spirochaetes. In: Hampson DJ & Stanton TB (eds.) *Intestinal Spirochaetes in Domestic Animals and Humans*, CAB International, Oxon, pp. 109–149.

175. Song Y, Hampson DJ (2009) Development of a multiplex qPCR for detection and quantitation of pathogenic intestinal spirochaetes in the faeces of pigs and chickens. *Vet Microbiol* 137: 129-136.
176. Song Y, La T, Phillips ND, Bellgard MI, Hampson DJ (2009) A reverse vaccinology approach to swine dysentery vaccine development. *Vet Microbiol* 137: 111–119.
177. Stanimirović M, Petrujkić B, Delić N, Djelić N, Stevanović J, Stanimirović Z (2012) Dietary conjugated linoleic acid influences the content of stearinic acid in porcine adipose tissue. *Vet Med-Czech* 57: 92-100.
178. Stanimirović Z, Glavinić U, Stevanović J, Radović D, Ristanić M, Tarić E, Lakić N (2017) Efficacy of plant-derived formulation “Argus Ras” in *Varroa destructor* control. *Acta Vet-Beograd* 67: 191-200.
179. Stanton (1992) Proposal to change the genus designation *Serpula* to *Serpulina* gen. nov. containing the species *Serpulina hyodysenteriae* comb. nov. and *Serpulina innocens* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 42: 189–190.
180. Stanton TB, Fournie-Amazouz E, Postic D, Trott DJ, Grimont PA, Baranton G, Hampson DJ, Saint Girons I (1997) Recognition of Two New Species of Intestinal Spirochetes: *Serpulina intermedia* sp. nov. and *Serpulina murdochii* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 47: 1007–1012.
181. Stanton TB, Rosey EL, Kennedy MJ, Jensen NS, Bosworth BT (1999) Isolation, oxygen sensitivity, and virulence of NADH oxidase mutants of the anaerobic spirochete *Brachyspira* (*Serpulina*) *hyodysenteriae*, etiologic agent of swine dysentery. *Appl Environ Microbiol* 65: 5028-5034.
182. Stanton TB (2006) The genus *Brachyspira*. In M Dworkin, S Falkow, E Rosenberg, K-H Schleifer, E Stackebrandt (eds.), *The Prokaryotes*, Vol. 7. Berlin: Springer, pp. 330–356.
183. Stanton TB, Humphrey SB, Sharma VK, Zuerner RL (2008) Collateral effects of antibiotics: carbadox and metronidazole induce VSH-1 and facilitate gene transfer among *Brachyspira hyodysenteriae* strains. *Appl Environ Microbiol* 74: 2950–2956.
184. Songer JG, Harris DL (1978) Transmission of swine dysentery by carrier pigs. *Am J Vet Res* 39: 913-916.

185. Šperling D, Smola J, Čížek A (2011) Characterisation of multiresistant *Brachyspira hyodysenteriae* isolates from Czech pig farms. *Vet Rec* 168: 215.
186. Taylor DJ, Alexander TJJ (1971) The production of dysentery in swine by feeding cultures containing a spirochaete. *Br Vet J* 127: 58–61.
187. Tatara MR, Sliwa E, Dudek K, Gawron A, Piersiak T, Dobrowolski P, Mosiewicz J, Siwicki A, Studzinski T (2008) Aged garlic extract and allicin improve performance and gastrointestinal tract development of piglets reared in artificial sow. *Ann Agric Environ Med* 15: 63–69.
188. Taylor DJ, Blakemore WF (1971) Spirochaetal invasion of the colonic epithelium in swine dysentery. *Res Vet Sci* 12: 177-179.
189. ter Huurne AA, Muir S, van Houten M, van der Zeijst BA, Gaastra W, Kusters JG (1994) Characterization of three putative *Serpulina hyodysenteriae* hemolysins. *Microb Pathogenesis* 16: 269-282.
190. Thomsen LE, Knudsen KE, Jensen TK, Christensen AS, Møller K, Roepstorff A (2007) The effect of fermentable carbohydrates on experimental swine dysentery and whip worm infections in pigs. *Vet Microbiol* 119: 152–163.
191. Thomson JR, Smith WJ, Murray BP (1998) Investigations into field cases of porcine colitis with particular reference to infection with *Serpulina pilosicoli*. *Vet Rec* 142: 235-239.
192. Thomson JR, Smith WJ, Murray BP, Murray D, Dic JE, Sumption KJ (2001) Porcine enteric spirochete infections in the UK: surveillance data and preliminary investigation of atypical isolates. *Anim Health Res Rev* 2: 31–36.
193. Trott DJ, Oxberry SL, Hampson DJ. (1997b) Evidence for *Serpulina hyodysenteriae* being recombinant, with an epidemic population structure. *Microbiology* 143: 3357–3365.
194. Upadhaya SD, Lee KY, Kim IH (2014) Protected organic acid blends as an alternative to antibiotics in finishing pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 27: 1600-1607.
195. Valenzuela-Grijalva NV, Pinelli-Saavedra A, Muhlia-Almazan A, Domínguez-Díaz D, González-Ríos H (2017) Dietary inclusion effects of

- phytochemicals as growth promoters in animal production. *J Anim Sci Technol* 59: 8.
196. Van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, Grenfell BT, Levin SA, Robinson TP, Teillant A, Laxminarayan R (2015) Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc Natl Acad Sci* 112: 5649-5654.
 197. Vande Maele L, Heyndrickx M, Dominiek MAES, Nele DE, Maxime MAHU, Verlinden M, Haesebrouck F, Martel A, Pasmans F, Boyen F (2016) In vitro susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae* to organic acids and essential oil components. *J Vet Med Sci* 78: 325-328.
 198. Vondruskova H, Slamova R, Trckova M, Zraly Z, Pavlik I (2010) Alternatives to antibiotic growth promoters in prevention of diarrhoea in weaned piglets: a review. *Vet Med* 55: 199–224.
 199. Wanchanthuek P, Bellgard MI, La T, Ryan K, Moolhuijzen P, Chapman B, Black M, Schibeci D, Hunter A, Barrero R, Phillips ND (2010) The complete genome sequence of the pathogenic intestinal spirochete *Brachyspira pilosicoli* and comparison with other *Brachyspira* genomes. *PLoS ONE* 5: e11455.
 200. Warneke HL, Kinyon JM, Bower LP, Burrough ER, Frana TS (2014) Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for rapid identification of *Brachyspira* species isolated from swine, including the newly described “*Brachyspira hampsonii*”. *J Vet Diagn Invest* 26: 635–639.
 201. Waters WR, Hontecillas R, Sacco RE, Zuckermann FA, Harkins KR, Bassaganya-Riera J, Wannemuehler MJ (2000) Antigen-specific proliferation of porcine CD8 α cells to an extracellular bacterial pathogen. *Immunology* 101: 333–341.
 202. Waters WR, Pesch BA, Hontecillas R, Sacco RE, Zuckermann FA, Wannemuehler MJ (1999) Cellular immune responses of pigs induced by vaccination with either a whole cell sonicate or pepsin-digested *Brachyspira* (*Serpulina*) *hyodysenteriae* bacterin. *Vaccine* 18: 711–719.
 203. Willems H, Reiner G (2010) A multiplex real-time PCR for the simultaneous detection and quantitation of *Brachyspira hyodysenteriae*,

- Brachyspira pilosicoli* and *Lawsonia intracellularis* in pig faeces. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 123: 205–209.
204. WHO (2012) The evolving threat of antimicrobial resistance: options for action. Geneva: World Health Organization. <http://www.who.int/iris/handle/10665/44812>. Accessed: 26 May 2018
205. Whipp SC, Harris DL, Kinyon JM, Songer JG, Glock RD (1978) Enteropathogenicity testing of *Treponema hyodysenteriae* in ligated colonic loops of swine. *Am J Vet Res* 39: 1293–1296.
206. Whipp SC, Robinson IM, Harris DL, Glock RD, Matthews PJ, Alexander TJ (1979) Pathogenic synergism between *Treponema hyodysenteriae* and other selected anaerobes in gnotobiotic pigs. *Infect Immun* 26: 1042–1047.
207. Wilcock BD, Olander HJ (1979a) Studies on the Pathogenesis of Swine Dysentery: I. Characterization of the Lesions in Colons and Colonic Segments Inoculated with Pure Cultures or Colonic Content Containing *Treponema hyodysenteriae*. *Vet Pathol* 16: 450–465.
208. Wilcock BD, Olander HJ (1979b) Studies on the pathogenesis of swine dysentery: II. Search for a cytotoxin in spirochetal broth cultures and colon content. *Vet Pathol* 16: 567–573.
209. Willems H, Reiner G (2010) A multiplex real-time PCR for the simultaneous detection and quantitation of *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli* and *Lawsonia intracellularis* in pig faeces. *Berl Munch Tierarztl* 123: 205-209.
210. Windisch W, Schedle K, Plitzner C, Kroismayr A (2008) Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. *J Anim Sci* 86 (14 Suppl) E140-E148.
211. Windsor EN, Simmons JR (1981) Investigation into the spread of swine dysentery in 25 herds of East Anglia and assessment of its economic significance in five herds. *Vet Rec* 122: 482–484.
212. Witchell TD, Coutts SA, Bulach DM, Adler B (2006) Differential expression of the Bhmp39 major outer membrane proteins of *Brachyspira hyodysenteriae*. *Infect Immun* 74: 3271–3276.
213. Wood EN, Lysons RJ (1988) Financial benefit from the eradication of swine dysentery. *Vet Rec* 121: 277–279.

214. Yan L, Kim IH (2011) Effect of dietary grape pomace fermented by *saccharomyces boulardii* on the growth performance, nutrient digestibility and meat quality in finishing pigs. *Asian-Australas J Anim Sci* 24: 2806-2813.
215. Yang C, Chowdhury K, Hou Y, Gong J (2015) Phytogetic compounds as alternatives to in-feed antibiotics: potentials and challenges in application. *Pathogens* 4: 137-156.
216. Zanchi R, Canzi E, Molteni L Scozzoli M (2008) Effect of *Camellia sinensis* L. whole plant extract on piglet intestinal ecosystem. *Ann Microbiol* 58: 147–152.
217. Zeng Z, Zhang S, Wang H, Piao X (2015) Essential oil and aromatic plants as feed additives in non-ruminant nutrition: a review. *J Anim Sci Biotechno* 6: 7.
218. Zimmerman J, Karriker L, Ramirez A, Schwartz K, Stevenson G (2012) Brachyspiral Colitis. *In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW (eds.), Diseases of Swine, 10th edition. Wiley-Blackwell. pp. 680-696.*
219. Zuerner RL, Stanton TB, Minion FC, Li C, Charon NW, Trott DJ, Hampson DJ (2004) Genetic variation in *Brachyspira*: chromosomal rearrangements and sequence drift distinguish *B. pilosicoli* from *B. hyodysenteriae*. *Anaerobe* 10: 229–237.

БИОГРАФИЈА КАНДИДАТА

Никола Делић рођен је 05. 02. 1969. Године у Зелени, Република Српска, БИХ. Основну школу завршио је у Мајданпеку, а средњу медицинску школу у Зајечару. Факултет ветеринарске медицине (тада: Ветеринарски факултет) Универзитета у Београду уписао је 1988. године, а завршио 1994. године са просечном оценом **9.23**. Од 1995. године запослен је на Институту за сточарство у Земуну где учествује у реализацији пројеката које финансира Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (МПНТР РС) и обавља послове здравствене заштите и репродукције домаћих животиња на експерименталним фармама Огледног центра Института. Активан је учесник у остварењу програма сарадње Факултета ветеринарске медицине и Института за сточарство у извођењу практичне наставе студената Факултета ветеринарске медицине.

Од 1996. године континуирано је ангажован на научноистраживачким пројектима Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије. Библиографија Николе Делића броји 24 публикације, од којих је 17 објављено у научним часописима. Од тог броја, три рада су објављена у међународним часописима М23 категорије, два у часописима међународног значаја М24 категорије, а 12 радова у часописима националног значаја (11 у часописима М51 категорије и један у часопису М52 категорије). Остале публикације су типа саопштења на међународним и националним скуповима.

Ожењен је Светланом и отац Филипа и Анђеле.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Никола Делић

број уписа 12/30

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Испитивање ефикасности фитогених адитива у контроли
дизентерије свиња уз праћење производних резултата одлучене
прасади природно инфициране бактеријом *Brachyspira hyodysenteriae***

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 28. 05. 2018. год.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Никола Делић

Број уписа 12/30

Студијски програм Докторске студије

Наслов рада Испитивање ефикасности фитогених адитива у контроли
дизентерије свиња уз праћење производних резултата одлучене прасади
природно инфициране бактеријом *Brachyspira hyodysenteriae*

Ментори Проф. др Јевросима Стевановић и Проф. др Божидар Савић

Потписани Никола Делић

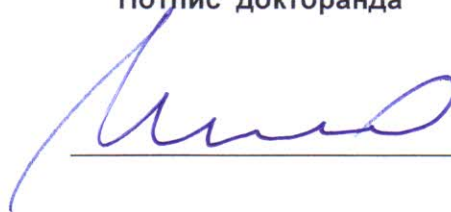
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 28. 05. 2018. год.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Испитивање ефикасности фитогених адитива у контроли дизентерије свиња уз праћење производних резултата одлучене прасади природно инфициране бактеријом *Brachyspira hyodysenteriae*

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 28. 05. 2018. год.

Потпис докторанда



Никола Делић